UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1962 — N° 24

LA CONSERVATION DE LA VIE AUX BASSES TEMPÉRATURES

Etude expérimentale de l'effet protecteur de substances minérales et organiques sur la moelle osseuse

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN PHARMACIE

(Diplôme d'Etat)

présentée et soutenue publiquement en Novembre 1962

PAR

PHAN THE TRAN

Membres du Jury

MM. VINCENT — *Président*

CAUJOLLE, ROUX, REY — *Assesseurs*

STANISLAS — *Suppléant*

TOULOUSE
IMPRIMERIE MODERNE
22, rue Sainte-Ursule, 22
—
1962

UNIVERSITE DE TOULOUSE

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

DOYEN. . . . . M. LAZORTHES
ASSESSEUR. . . . . M. BLANC
Doyens Honoraires. . . . . MM. GORSE, CALVET, LEFEBVRE, BRUSTIER

Professeurs honoraires. . . . MM. RIBAUT, VALLOIS, NANTA, DUCUING, TAPIE, DELAS, RISER, SOULA

SECTION MEDECINE

PROFESSEURS

Clinique Médicale.	MM. MERIEL	Accouchement et obstétricie sociale.	MM. PONTONNIER
Clinique Médicale.	GADRAT	Anatomie.	LAZORTHES
Clinique chirurgicale et gynécologique.	FABRE (P.)	Anatomie appliquée.	POULHES
Clinique chirurgicale et du Cancer.	GRIMOUD	Anatomie pathologique. . . .	FABRE (J.)
Clinique chirurgicale infantile et Orthopédie.	VIRENQUE	Bactériologie, Hygiène et Médecine sociale.	ANDRIEU
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques. . . .	BAZEX	Chimie biologique.	VALDIGUIE
Clinique des maladies de la Tuberculose et Pathologie interne.	MOREL	Electro-Radiologie.	MARQUES
Clinique des maladies des voies urinaires.	LHEZ	Embryologie.	BROUSSY
Clinique médicale infantile et Puériculture.	SOREL	Histologie.	BIMES
Clinique de Neurologie et Psychiatrie.	GERAUD	Hydrologie thérapeutique et climatologie.	DARNAUD
Clinique obstétricale.	GUILHEM	Médecine Légale et du Travail.	PLANQUES
Clinique odonto-stomatologique.	CADENAT (H.)	Médecine Sociale.	BOUNHOURE
Clinique ophtalmologique. .	CALMETTES	Parasitologie.	BOUISSET
Clinique O.R.L. et de chirurgie maxillo-faciale. . . .	CALVET	Pathologie chirurgicale. . .	DAMBRIN
Clinique rhumatologique	RUFFIE (R.)	Pathologie générale et Médecine expérimentale. . .	SENDRAIL
Clinique traumatologique des membres.	RIEUNAU	Physico-Chimie.	AUVERGNAT
		Physiologie.	LAPORTE (Y.)
		Physiologie appliquée et Pharmacologie.	BAISSET
		Physique biologique et médicale.	BUGNARD
		Propédeutique médicale. . .	N.
		Thérapeutique.	DARDENNE

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Anatomie générale et comparée.	M. COULOUMA	Pathologie médicale.	M. LAPORTE (J.)
		Bactériologie.	Mme ENJALBERT

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Biochimie médicale.	M DOUSTE-BLAZY	Physique médicale.	M. BRU

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Anatomie	MM. BASTIDE	Parasitologie	MM. RUFFIE (J.)
Anatomie pathologique. . . .	BOUISSOU	Pathologie expérimentale. . .	GLEIZES
Anesthésiologie	LARENG	Physiologie	MONTASTRUC
Carcinologie	ESTRADE	Physiologie.	BESSOU
Histologie et Embryologie. .	PLANEL	Physique médicale	COMMANAY

AGREGES

Pathologie médicale.	MM. MONNIER	Pathologie Chirurgicale . . .	MM. SOUQUET
	RIBAUT		SARRAZIN
	DELAUDE	Dermatologie et syphiligraphie	DUPRÉ
	CALAZEL	Hydrologie	DENARD
	RASCOL	Médecine légale	GREZES-RUEFF
Pathologie chirurgicale. . .	ENJALBERT	Obstétrique	ESPAGNO
	FICAT	Odontostomalogie.	N.
	PASQUIE	Pédiatrie	BARDIER

AGREGES LIBRES

Anatomie.	MM. THOMAS	O. R. L.	CLAUX
Ophtalmologie	DEODATI	Pathologie chirurgicale. . .	MM. DIEULAFE

SECTION PHARMACIE

PROFESSEURS

Botanique et cryptogamie . .	Mme DULUCQ-MATHOU	Matière Médicale.	MM. VINCENT
Chimie analytique, Toxicologie et Hygiène industrielle	M. BOURBON	Pharmacie chimique, pharmacodynamie.	CAUJOLLE
Chimie pharmaceutique. . . .	BLANC	Pharmacie galénique	M. STANISLAS
Zoologie.	ROUX		

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Pharmacie. . . . . M. COUTURIER

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Sciences Naturelles. . . . . Mme CAUJOLLE

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Microbiologie	M. BREUILLAUD	Sciences Physiques.	M. PITET
Toxicologie	BROUSSY (G.)		

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Secrétaire Principal. . . . . M. ROCHE — Secrétaire. . . . . M. BERRUT

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats
(Délibération en date du 12 mai 1891)

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1962 — Nº 24

LA CONSERVATION DE LA VIE AUX BASSES TEMPÉRATURES

Etude expérimentale de l'effet protecteur de substances minérales et organiques sur la moelle osseuse

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN PHARMACIE

(Diplôme d'Etat)

présentée et soutenue publiquement en Novembre 1962

PAR

PHAN THE TRAN

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Membres du Jury

MM. VINCENT — *Président*

CAUJOLLE, ROUX, REY — *Assesseurs*

STANISLAS — *Suppléant*

TOULOUSE

IMPRIMERIE MODERNE

22, rue Sainte-Ursule, 22

—

1962

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546525_0085

A LA MEMOIRE DE MA MERE

A MON PERE, A MA MERE ADOPTIVE

A MES BEAUX-PARENTS

A MA FEMME, A MES FILS

Avec mon amour et ma tendresse

A MES SŒURS, A MES BEAUX-FRERES

A TOUS LES MIENS

A S.E. MONSIEUR NGUYEN DINH THUAN

Secrétaire d'Etat à la Présidence
Secrétaire d'Etat-Adjoint à la Défense Nationale
Président du Conseil d'Administration de l'Office National
de l'Energie Atomique du Viet-Nam

A MONSIEUR LE PROFESSEUR N.P. BUU HOI

Directeur Général de l'Office National
de l'Energie Atomique du Viet-Nam

A NOTRE MAÎTRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR D. VINCENT

Professeur de Matière Médicale

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans votre grande bonté. Nous avons trouvé auprès de vous les conseils et les encouragements qui nous ont aidé à mener à bien nos recherches.

Qu'il nous soit permis de vous exprimer notre profonde reconnaissance et de vous assurer de notre entier dévouement pour le grand honneur que vous nous faites, en acceptant de présider le Jury de notre thèse.

A NOTRE JURY DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR F. CAUJOLLE

Professeur de Pharmacie Chimique et de Pharmacodynamie
Membre Correspondant de l'Académie de Médecine
Directeur du Centre de Recherches sur les Toxicités
Officier de la Légion d'Honneur

Qu'il nous soit permis de vous exprimer notre déférente gratitude pour la grande bienveillance que vous nous avez toujours témoignée. Nous vous remercions pour le grand intérêt que vous portez à nos recherches. Nous sommes heureux de vous exprimer notre profonde reconnaissance pour l'honneur que vous nous faites, en acceptant de juger notre travail.

MONSIEUR LE PROFESSEUR G. ROUX

Professeur de Zoologie

Nous vous exprimons nos respectueux remerciements pour l'honneur que vous nous faites, en acceptant de juger notre travail.

MONSIEUR LE PROFESSEUR L. REY

Ancien Elève de l'Ecole Normale Supérieure
Maître de Conférence à la Faculté des Sciences de Dijon

Vos découvertes fondamentales en Cryobiologie ont inspiré nos recherches. Nous sommes très honoré de votre présence à notre Jury de thèse et nous vous exprimons notre déférente gratitude pour l'honneur que vous nous faites, en acceptant de juger notre travail.

MONSIEUR LE PROFESSEUR E. STANISLAS

Professeur de Pharmacie Galénique

Nous vous exprimons nos sincères remerciements pour l'honneur que vous nous faites, en acceptant de juger notre travail.

Il nous est particulièrement agréable d'exprimer à notre Maître, Monsieur le Professeur D. VINCENT, Professeur de Matière Médicale à la Faculté de Médecine et Pharmacie de Toulouse, notre profonde gratitude et notre vive reconnaissance pour la sollicitude avec laquelle il nous a conseillé et encouragé dans nos recherches Nous le remercions pour le grand honneur qu'il nous fait, en acceptant de présider le Jury de notre thèse.

Nos sentiments de fidélité et de dévouement vont à Monsieur le Professeur N.P. BUU HOI, Directeur Général de l'Office National de l'Energie Atomique du Viet-Nam, qui nous a hautement honoré en nous confiant la direction du Service de Radiobiologie.

Nous avons pu mener à bien la réalisation de ce travail, grâce à l'obligeance de Monsieur le Professeur A. HOLLAENDER, qui a mis à notre disposition les immenses possibilités de son laboratoire, Oak Ridge National Laboratory, Biology Division, Oak Ridge, Tennessee (E.U.). Nous remercions notre Chef de Service, Monsieur le Docteur C.C. CONGDON, de l'intérêt constant qu'il a manifesté pour nos recherches et nous assurons notre ami, Monsieur le Docteur M.A. BENDER, du grand plaisir que nous avons tiré de sa collaboration.

Nous remercions Monsieur le Professeur L.H. GRAY, F.R.S., Mount Vernon Hospital, Londres (Angleterre), et Monsieur le Professeur P.L.T. ILBERY, School of Preventive Medicine, University of Sydney, Sydney (Australie), de nous avoir permis de présenter les résultats de nos recherches au 2 nd Congrès International de Recherches sur les Radiations, 1962, Harrogate (Angleterre), et à la 3e Conférence Australienne de Radiobiologie, 1960, Sydney (Australie).

Nous remercions la Direction Générale des Affaires Culturelles et Techniques du Ministère des Affaires Etrangères à Paris et la Mission Française d'Aide Economique et Technique à Saïgon, d'avoir rendu possible notre présent séjour à Toulouse.

INTRODUCTION

La mise au point de thermomètres précis par Farenheit en 1714 et par Réaumur en 1731 permit aux biologistes d'étudier plus quantitativement l'action du froid sur la cellule vivante. Les basses températures qui permirent à Spallanzani (1787) d'observer les effets du froid sur divers animaux ainsi que sur des cellules isolées comme spermatozoïdes et ovocytes de diverses espèces animales, furent obtenues par l'addition de nitrates à un mélange de glace et de chlorures.

L'obtention de l'oxygène liquide par Cailletet et Pictet en 1877 et de l'hydrogène liquide par Dewar en 1898, amenèrent les biologistes à étudier les effets de très basses températures sur la cellule vivante. Brown et Escombe trouvèrent que le pouvoir germinatif des graines n'était pas détruit par conservation aux températures de l'air liquide, si on emploie la congélation lente. Les mêmes résultats furent obtenus par Thiselton-Dyer (1899) qui utilisa l'hydrogène liquide. Macfadyen et Rowland (1900 a, b) montrèrent que les bactéries conservaient intacte leur viabilité et les enzymes une activité inaltérée aux températures de l'air et de l'hydrogène liquides. Les travaux concernant les effets des basses températures sur la cellule vivante, ont été exposés dans des monographies classiques par Bélehradek (1935), Luyet et Gehenio (1940), Smith (1954), Rey (1960), Parkes et Smith (1960), Smith (1961). Les problèmes soulevés au cours de ces recherches seront repris dans notre étude par l'emploi d'une nouvelle technique, celle de la transplantation de moelle osseuse isologue chez la souris léthalement irradiée.

Il est possible de conserver la viabilité de la moelle osseuse dans du Tyrode pendant 2 jours à la température ambiante (22-25° C) et jusqu'à 5 jours quand elle est gardée au refrigérateur (2-5° C) (Urso et Congdon,

1957). L'emploi des basses températures est cependant nécessaire quand on désire obtenir une survie prolongée de ces cellules. Il existe plusieurs hypothèses pour expliquer la conservation de la vie aux basses températures.

Luyet (1952) se base sur la théorie de Tamman (1898), selon laquelle il serait possible de ramener tout fluide à l'état vitreux par congélation ultrarapide. Tamman postule que la cristallisation à lieu aux environs du point de congélation de la solution ; à température inférieure et hors de cette région elle serait impossible, car les molécules n'auraient pas suffisamment de mobilité pour acquérir les nouvelles positions nécessaires à la formation d'une structure cristalline. Tamman pense que ces molécules seraient immobilisées à leur position initiale : le solide obtenu serait donc amorphe et vitreux. Luyet de son côté pense qu'on peut éviter la mort de la cellule soumise aux basses températures, si on fait passer directement le protoplasme de l'état liquide à l'état vitreux. Ses expériences de congélation ultra-rapide par immersion dans des gaz liquéfiés (—150° à —196° C) de minces pellicules de protéines, glucides, polyalcools et le passage de ces produits à l'état vitreux, de même ses expériences avec les cellules vivantes sont de très valables démonstrations de sa théorie.

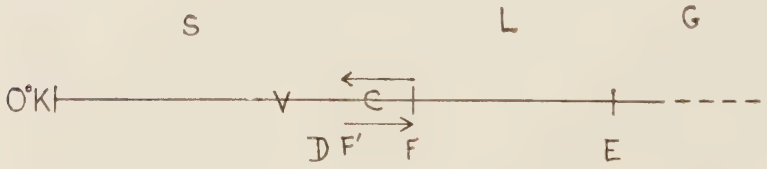

Fig. I. — Figure représentant sur une échelle de température dont l'origine est le zéro absolu O°K :

1 - les trois états de la matière : gazeux G, liquide L, solide S ;

2 - les deux formes de l'état solide : cristallin C, vitreux V ;

3 - le point d'ébullition E et le point de congélation F ;

4 - la limite inférieure F' de la région thermique à laquelle un liquide cristallise facilement ;

5 - la température de dévitrification D, c'est-à-dire la température à laquelle l'état vitreux passe à l'état cristallin.

La flèche supérieure indique la vitesse requise pour vitrifier un liquide et la flèche inférieure celle requise pour prévenir la dévitrification (LUYET, 1952).

Lovelock (1953b; 1594b) travaillant sur la conservation des érythrocytes montre que le dommage causé à ces cellules durant la congélation est dû à l'augmentation de la concentration saline extracellulaire. La concentration en électrolytes du milieu augmente par suite de la transformation graduelle des molécules d'eau en cristaux de glace. D'autre part, les érythrocytes sont plus perméables aux ions Na^+ qu'aux ions Cl^- ; à la décongélation la pression osmotique interne exercée par les ions Na^+ fera éclater l'érythrocyte. Lovelock préconise la congélation de ces cellules en présence de glycérol ou de tout autre composé organique atoxique qui possède la propriété de réduire la concentration en électrolytes durant la congélation

Il est intéressant de vérifier la portée de ces théories à la lumière d'une technique nouvelle, celle de la greffe de moelle osseuse isologue chez un mammifère irradié léthalement en totalité.

CHAPITRE PREMIER

TECHNIQUE D'ETUDES : LA GREFFE DE CELLULES MEDULLAIRES ISOLOGUES CHEZ LA SOURIS LETHALEMENT IRRADIEE

La restauration hématopoïétique a été obtenue chez la souris et le cobaye irradiés à doses léthales par injection de moelle osseuse fraîche (LORENZ et coll., 1951). Cette restauration est le résultat de la greffe des cellules hématopoïétiques injectées qui prolifèrent chez l'hôte irradié et remplacent les cellules détruites par l'irradiation. Quand l'hôte et le donneur sont isologues (1), la restauration est presque complète ; par contre en cas de restauration homologue ou hétérologue, une maladie de nature immunologique due à une réaction entre l'hôte et les cellules du donneur, entraîne la mort de la plupart des animaux (CONGDON, 1959 ; SMITH et CONGDON, 1960).

Il est donc intéressant d'employer cette technique de transplantation de cellules médullaires isologues chez un mammifère irradié léthalement en totalité, en l'occurence la souris, afin d'y suivre la destinée des cellules injectées. Chez la souris irradiée la mort survient des suites d'une aplasie médullaire ; la survie de la souris irradiée, injectée avec une suspension de cellules médullaires vivantes est le résultat de la multiplication *in vivo* de ces cellules. L'utilisation de la transplantation de moelle osseuse dans l'étude de la conservation de la vie cellulaire présente un grand intérêt : la survie de la souris léthalement irradiée, injectée avec des cellules médullaires, est essentiellement un indice de la capacité de reproduction de ces cellules.

(1) Les termes établissant une relation générale entre les tissus du donneur et du récepteur sont ainsi définis : isologue, membre de la même race pure ; homologue, membre d'une race différente de la même espèce ; hétérologue, membre d'une espèce différente.

D'autres méthodes employées auparavant ne mesuraient que certaines fonctions de la cellule, par exemple sa motilité ou sa perméabilité (Schrek, 1936 ; Hoskins et coll., 1956).

I. — Animaux utilisés :

Ce sont des souris hybrides C57BLx101 de première génération. Ces hybrides des deux sexes sont âgés de 12 à 16 semaines, répartis au hasard avant l'utilisation ; après l'irradiation ils sont groupés par cage de 5 et ont libre accès à la nourriture (2) et à la boisson.

II. — Conditions d'irradiation :

Ces hybrides (C57BLx101) F_1 sont soumis en totalité à 900r de rayons X. On utilise un appareil Philips à potentiel constant. Les conditions d'irradiation sont les suivantes : 250 kvp, 15 ma, 1 mm Al. La distance à l'animal est de 60 cm. Le débit de dose est d'environ 160 r par minute.

III. — Préparation des suspensions cellulaires :

Les donneurs isologues sont tués par décapitation. La moelle osseuse fémorale est mise en suspension dans un soluté de Tyrode (3). Lorsqu'on désire étudier un produit, on le dissout dans le soluté de Tyrode. Dans certaines expériences, afin d'empêcher l'agglutination des cellules médullaires, l'emploi d'un soluté de Tyrode contenant 3,50 % de polyvinylpyrrolidone (4) fut nécessaire.

Les cellules sont comptées à l'hématocytomètre, après dilution avec le liquide de Wright (on ajoute 2-8 gouttes de colorant de Wright, solution méthylique d'éosine et de bleu de méthylène, à une solution 0,1 N ClH jusqu'à obtention de la coloration désirée ; on filtre 2 ou 3 fois pour enlever le précipité formé). Les suspensions médullaires sont ensuite diluées à $2x10^6$ cellules/ml.

(2) Aliment synthétique complet de composition constante « Laboratory Chow », Ralston Purina Company, Saint-Louis, Missouri, E. U.

(3) ClNa 8g ; ClK 0,20g ; Cl_2Ca 0,20g ; Cl_2Mg, 6 H_2O 0,20g ; PO_4H_2Na 0,05g ; CO_3HNa 1g ; glucose 1g ; eau q.s.p. 1000 ml.

(4) Vinisil, Abbot Laboratories, North Chicago, Illinois, E. U .

Les souris reçoivent par la veine caudale 10^6 cellules médullaires nucléées sous un volume de 0,5 ml. Pour chaque expérience nous avons établi deux séries de contrôle : un groupe de souris irradiées ne recevant pas de moelle osseuse et un autre groupe recevant des cellules médullaires fraîches.

IV. — Technique de congelation : Méthode de Bender, Phan et Smith (1960) :

Les suspensions cellulaires sont réparties dans des tubes pyrex 10 x 100 mm. La congélation « lente » est faite dans une machine (5) qui utilise comme réfrigérant du gaz carbonique solidifié. Cet appareil abaisse la température du bain d'alcool, de la température ambiante 20° C à — 25° C, à la vitesse de 1° C par minute. Les tubes de suspension médullaire sont ensuite portés directement à — 196° C par immersion dans un bain d'azote liquide et laissés pendant une heure.

La décongélation « rapide » est faite en portant directement les tubes congelés dans un bain à 37° C. Elle se fait rapidement en moins d'une minute.

V. — Températures de Conservation :

Les suspensions médullaires congelées en présence de glycérol 15 % sont placées sous un volume de 1,5 ml dans des tubes pyrex 10 x 100 mm. Ces tubes sont placés pour les expériences de conservation prolongée à 3 températures différentes : — 30° C dans un réfrigérateur, — 79° C dans une armoire à gaz carbonique solidifié, —196° C dans un récipient à azote liquide (6).

VI. — Mesure de la survie des cellules médullaires :

A. — Mesure in vitro. Méthode de Schrek (1936) : Cette technique utilise la propriété qu'ont les cellules vivantes de rejeter les corps toxiques étrangers, en particulier les colorants. Une goutte d'éosine à 1/500 dans du Tyrode est ajoutée à une goutte de suspension médul-

(5) Canalco, Bethesda, Maryland, E. U.
(6) Linde et Co., New-York City, N.Y., E.U.

laire. On compte le taux de cellules médullaires nucléées qui rejettent le colorant ; ces cellules sont supposées être vivantes.

B. — Mesure in vivo. Greffe de moelle osseuse isologue chez la souris irradiée léthalement : on observe la survie chez la souris irradiée et injectée avec 10^5 cellules médullaires nucléées. Chez la souris non traitée, la mort survient entre le 8e et le 15e jour des suites d'une aplasie médullaire. Chez la souris traitée avec une suspension de cellules médullaires fraîches, après une phase initiale de granulopénie et de thrombopénie dues à la disparition des éléments figurés, survient une phase de régénération due à la greffe des cellules médullaires injectées. Le retour à la normale du système hématopoïétique est complet, si on se garde de donner une dose trop forte de radiation ionisante qui risquerait de léser l'épithélium intestinal. Il existe une relation entre le nombre de cellules nucléées vivantes injectées et le taux de survie des souris irradiées et traitées. Dans le cas de la greffe de moelle osseuse isologue, aucun mécanisme de nature immunologique ne vient perturber la prolifération cellulaire. La survie de la souris traitée est donc le résultat de la multiplication, et par suite de la viabilité des cellules médullaires injectées (Smith et Congdon, 1960).

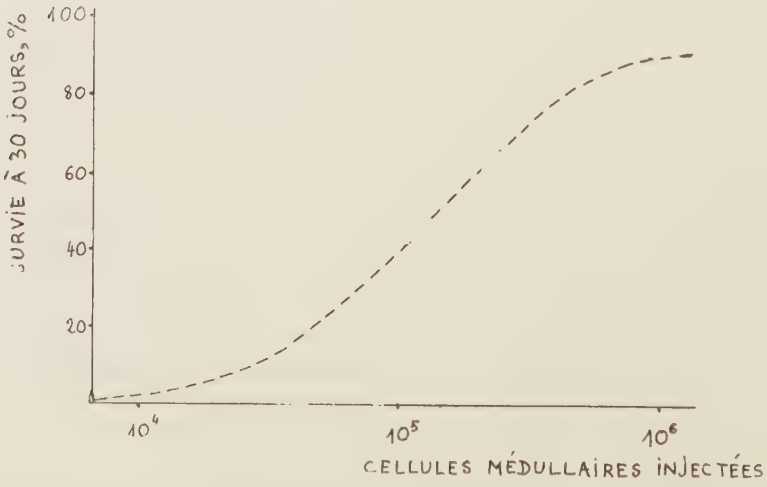

Fig. II. — Survie des souris (C57BLx101)F_1 léthalement irradiées, traitées avec des cellules médullaires fraîches

Chapitre II

INFLUENCE DES VITESSES DE CONGELATION ET DE DECONGELATION SUR LA SURVIE DES CELLULES MEDULLAIRES CONGELATIONS REPETEES

Barnes et Loutit ont montré qu'il est possible de maintenir la viabilité de la rate de jeune souris, soumise à congélation par la technique de Polge, Smith et Parkes (1949). Cette technique consiste en une congélation « lente » qui amène le bain d'alcool de la température ambiante à — 15° C à la vitesse de 1° C par minute et de — 15° C à — 70° C à la vitesse de 10° C par minute (Polge et Lovelock, 1952 ; Barnes et Loutit, 1955). D'autres techniques sont employées avec succès : jusqu'à — 15° C à la vitesse de 1° C par minute, puis jusqu'à —79° C à la vitesse de 5° C par minute (Pegg et Trotman, 1959) ; jusqu'à — 25° C à la vitesse de 1° C par minute, puis directement à — 79° C ou — 196° C (Bender, Phan et Smith, 1960).

Nos résultats montrent qu'il est impossible de conserver la viabilité des cellules médullaires par la congélation « lente » en l'absence de glycérol. Nous avons donc utilisé au cours des ces expériences du Tyrode contenant du glycérol 15 % (poids/volume) pour la préparation de nos suspensions cellulaires.

I. — Vitesses de congélation :

A part notre technique de congélation « lente », nous avons utilisé d'autres vitesses de congélation en immergeant directement les tubes de suspensions médullaires dans des bains à — 30° C et — 79° C (obtenus par des

mélanges adéquats de gaz carbonique solidifié et d'alcool éthylique) et à — 196° C (azote liquide). Les suspensions cellulaires ont été ensuite décongelées dans un bain à 37° C par décongélation « rapide ». Les résultats portés au tableau 1 montrent que la moelle osseuse congelée en présence de glycérol se conserve mieux quand elle est soumise à congélation « lente ». Une congélation « rapide » à — 79° C réduit de 70 % l'efficacité restauratrice des cellules médullaires; leur pouvoir restaurateur est complètement détruit quand ces cellules sont directement immergées à — 196° C. (PHAN et BENDER 1960 a).

TABLEAU 1

Survie des souris irradiées léthalement (900r) et injectées avec 10^6 cellules médullaires isologues congelées en présence de 15 % glycérol à différentes vitesses*

Moelle osseuse	*Milieu*	*Nombre d'expériences*	*Nombre de souris*	*Survie à 30 jours (%)*
0	—	5	58	0
Fraîche	Tyrode	5	54	82
Congelée « lentement ».	Tyrode	2	21	0
Congelée « lentement ».	Glycérol 15 %	5	49	88
Congelée « rapidement » à —30° C	»	1	10	80
Congelée « rapidement » à —79° C	»	2	20	25
Congelée « rapidement » à —196° C	»	1	10	0

* Les termes établissant les vitesses de congélation et de décongélation sont ainsi définis :

— Congélation « lente », jusqu'à —25° C, à la vitesse de 1°C/mn ;

— Congélation « rapide » à —30° C, —79° C, —196° C, congélation immédiate dans des bains portés à ces températures ;

— Décongélation « lente », dans un bain d'air à 4° C ;

— Décongélation « rapide », dans un bain à 37° C.

Pour les processus de congélation, toutes les préparations sont ensuite amenées directement à —196° C.

Les termes « lent » et « rapide » ne concernent que le bain de congélation ou de décongélation et ne préjugent en rien de l'abaissement ou de l'élévation de température des suspensions cellulaires.

Rey (1957a, 1960) cependant, travaillant sur le tissu cardiaque de l'embryon de poulet, trouve que la vitesse de congélation peut varier dans de larges limites sans modifier la viabilité des cellules si la décongélation est rapide et uniforme.

II. — Vitesses de décongélation :

Afin de vérifier si une décongélation « lente » aurait une meilleure influence sur la survie des cellules médullaires, nous avons décongelé les préparations au préalable congelées par diverses techniques, en les plaçant dans un bain d'air à 4° C jusqu'à décongélation complète. Une comparaison des résultats obtenus dans le tableau 2 avec ceux du tableau 1 montrent qu'avec la technique de décongélation « lente », la survie des souris irradiées injectées avec ces cellules est plus faible ; en aucun cas elle ne fut significativement meilleure (Phan et Bender, 1960 a).

TABLEAU 2

Effet de la décongélation « lente* » sur la survie des cellules médullaires congelées à différentes vitesses en présence de glycérol 15 %

Méthode de congélation	*Nombre d'expériences*	*Nombre de souris*	*Survie à 30 jours des souris irradiées injectées avec 10^6 cellules, %*
Congélation « lente »**.	1	13	0
Congélation « lente ».	3	30	47
Congélation « rapide » à —30° C	3	30	43
Congélation « rapide » à —79° C	2	20	30
Congélation « rapide » à —196° C	2	20	0

* dans un bain d'air à 4° C.

** Tyrode ne contenant pas de glycérol.

Nous devons cependant souligner que la vitesse de l'abaissement thermique dans le tube de suspension médullaire, dans un système aussi grossier que l'immersion directe du tube dans un bain frigorifique, dépend entièrement des caractéristiques du système.

« L'évolution thermique d'un objet immergé dans un bain à température constante est fort complexe. Elle dépend principalement de la nature de l'objet, de la nature du bain et du degré de contact qui s'établit entre eux. La chaleur spécifique du corps, sa conductibilité thermique, sa structure et sa taille sont autant de facteurs qui modifient le transfert de chaleur... En effet lorsqu'on refroidit un fragment de tissu, la température n'est pas uniforme dans toute sa masse. Le centre a tendance à se refroidir plus lentement et jusqu'à l'établissement de l'équilibre, le tissu est le siège de gradients thermiques qui peuvent être considérables... La nature du bain réfrigérant intervient également. Le refroidissement est d'autant plus rapide que la différence de température entre le bain et le tissu est plus grande » (Rey, 1960).

III. — Congélation et décongélation répétées :

Il est intéressant de voir le comportement des cellules médullaires soumises à congélation et décongélation répétées. Nous avons donc employé des suspensions de moelle osseuse dans du glycérol 15 %. Ces suspensions médullaires sont soumises à congélation « lente » et décongélation « rapide ». Les températures de conservation employées sont : — 30° C, — 79° C, — 196° C ; les suspensions médullaires sont conservées 2 jours avant chaque décongélation. Au cours de ces opérations, de nombreuses cellules se rassemblent en gros amas et sont considérées comme perdues de la suspension. Nous avons fait une numération globulaire et une mesure de la survie de ces cellules *in vitro* selon la technique de Schrek. De ces numérations, le nombre des cellules nucléées vivantes est calculé. Quoique la valeur du test de Schrek ne montre pas d'augmentation appréciable au cours de ces opérations, les cellules perdues par agglutination, sont invariablement éosine-positives ; ce qui montre que la mortalité cellulaire augmente à chaque congélation et décongélation. La perte cellulaire à chaque opération dépend de la

température de conservation, la meilleure température étant — 79° C. Si on compare la survie des souris irradiées injectées avec ces cellules, on remarque que la mortalité de la classe des cellules responsables de la restauration hématopoïétique est plus rapide que celle de la population entière de cellules nucléées. Les cellules souches se conservent mieux à — 30° C ; c'est donc à cette température que la perte différentielle est la moindre. La mortalité des cellules médullaires nucléées soumises à congélation « lente » et décongélation « rapide » répétées est en première approximation fonction exponentielle du nombre de fois où elles sont soumises à congélation (Phan et Bender, 1960 b).

TABLEAU 3

Effet de la moelle osseuse de souris soumise à congélation « lente » et décongélation « rapide » répétées sur la survie des souris irradiées à dose léthale (900r)

Température de conservation °C	Nombre de congélations	Nombre de cellules /ml (x 10^6)	Cellules éosine-positives, %	Cellules vivantes/ml (x 10^6)*	Nombre de souris	Survie à 30 jours des souris injectées avec 10^7 cellules, %
	0	0			76	0
—		22,6 (concentration originelle)	15	19,2	98	82
	1	18,5	31	12,7	15	100
	2	7,8	58	3,3	15	87
— 30	3	4,7	37	3,0	7	100
	4	3,5	59	1,4	16	50
	5	2,6	67	0,9	10	60
	1	20,1	47	10,6	14	93
	2	17,0	49	8,7	15	73
— 79	3	11,7	46	6,3	15	40
	4	8,8	43	5,0	33	58
	5	7,3	62	3,5	15	0
	1	19,7	62	9,5	15	93
	2	12,7	53	6,0	15	100
— 196	3	6,7	48	3,5	12	33
	4	5,2	56	2,3	23	44
	5	5.4	87	0,7	15	0

* (Nombre de cellules /ml) x $\frac{(100 - \%\text{ cellules éosine-positives})}{100}$

Le phénomène du choc thermique est observé aux températures aussi bien supérieures qu'inférieures à 0° C. Ainsi les spermatozoïdes de taureau et de bélier perdent leur motilité quand ils sont amenés directement de 15° C à 0° C (Anderson, 1954). Un abaissement graduel de température prévient ce phénomène (Chang et Walton, 1940). Les cellules leucémiques de la souris, transplantées après décongélation rapide ne se greffent plus (Breedis, 1942). Les spermatozoïdes humains survivent à — 79° C ou — 196° C, seulement si la congélation est lente (Parkes, 1945). Ceci est vrai aussi bien pour les cellules isolées que pour les tissus : protozoaires pathogènes (Weinman et Mac Allister, 1947 ; Fulton et Smith, 1953) ovocytes de mammifères (Smith, 1952), tissu testiculaire (Deanesly, 1954), tissu cutané (Billingham et Medawar, 1952 a, b ; Billingham 1954).

Le choc osmotique qui résulte de l'augmentation de la concentration ionique est observée lors de la formation graduelle des cristaux de glace au point de congélation des suspensions cellulaires. Le choc osmotique est un facteur important de la mort de la cellule soumise à congélation. Il est possible de reproduire quantitativement l'hémolyse des érythrocytes soumis à congélation et décongélation à une certaine température, en les exposant à une solution de ClNa possédant la même molarité que la fraction liquide d'une solution isotonique amenée à cette température, puis en les retournant à l'isotonie. Il existe une région critique pour les érythrocytes, comprise entre le point de congélation de 0,8M ClNa (—3° C) et la température eutectique du cytoplasme de l'erythrocyte (—40° C). Cette hémolyse est le résultat de plusieurs causes. A concentration supérieure à 0,8M ClNa, les érythrocytes deviennent perméables aux ions Na^+ ; quand ils sont remis en suspension dans une solution isotonique, la pression interne qui en résulte tend à les hémolyser. Il est aussi démontré que les érythrocytes sont sensibilisés aux traumatismes mécaniques quand ils ont été soumis à une solution saline concentrée. D'autre part, à concentration supérieure à 3M ClNa les solutions salines détruisent les érythrocytes par lyotropie. D'autres composés minéraux tels que ILi et SCNK possèdent cette propriété lyotropique à concentration beaucoup plus faible (Lovelock, 1953a, b ; 1954a).

Il faut cependant souligner la grande variation dans le comportement des cellules soumises au choc osmotique. Ainsi la survie des érythrocytes soumis à congélation rapide (Strumia, 1949 ; Luyet, 1949, 1952) peut être expliquée par la lenteur de l'action des solutions salines concentrées (Lovelock 1953a). La survie de certaines cellules : spermatozoïdes humains (Parkes, 1945), tissu cutané (Billingham et Medawar, 1952a), cellules cancéreuses (Passey et Dmochowski, 1950) quand elles sont rapidement congelées, est peut-être le résultat de certaines différences de perméabilité et de résistance aux chocs thermique et osmotique. D'autres cellules très sensibles au changement de pression osmotique de leur milieu, telles que les spermatozoïdes de lapin, sont aisément détruites par la congélation (Emmens, 1948 ; Lovelock, 1953a).

Il existe donc un antagonisme entre le choc thermique causé par une vitesse excessive de congélation et le choc osmotique qui résulte de l'augmentation de la concentration ionique. Ce choc osmotique observé lors de la formation des cristaux de glace au point de congélation, est prolongé par la congélation lente. Il s'agit donc de trouver des vitesses de congélation et de décongélation convenables pour chaque type cellulaire.

Chapitre III

ACTION DES COMPOSES ORGANIQUES SUR LA SURVIE DES CELLULES MEDULLAIRES SOUMISES A CONGELATION

La protection conférée par certains composés organiques à la cellule soumise à congélation, n'est pas une notion nouvelle. Ainsi le saccharose protège 20 % des spermatozoïdes de grenouille congelés à la température de l'air liquide (Luyet et Hodapp, 1938) et le lévulose protège la viabilité de 30 % des spermatozoïdes de poulet à —79° C (Shaffner, 1942). Le glucose est capable de préserver la viabilité des cellules tumorales amenées à basses températures (Craigie, 1949). L'éthylène glycol a été utilisé avec succès dans la préservation de certains tissus embryonnaires de poulet soumis à congélation ultrarapide (Luyet, 1952). La protection conférée par ces produits est attribuée à la déshydratation préalable de la cellule, qui empêcherait ainsi la cristallisation intra-cellulaire et favoriserait la vitrification de l'eau à l'intérieur de la cellule (Luyet, 1952).

Divers composés ont été employés au cours de ce travail pour protéger la moelle osseuse de souris soumise à congélation « lente » et décongélation « rapide ».

I. — Composés a poids moléculaire élevé.

Ces composés traversent difficilement la membrane cellulaire à cause de la grosseur de leur molécule. Notre expérience avec des protéines sériques ainsi qu'avec divers polymères employés dans la composition de solutés isotoniques, confirment la faible valeur protectrice de ces produits. Cette protection, faible avec le dextrane et avec l'albumine sérique bovine, est nulle si on utilise la polyvinylpyrrolidone ou le sérum de souris.

TABLEAU 4

Survie des souris irradiées léthalement (900r) traitées avec 10^6 cellules médullaires congelées en présence de composés à poids moléculaire élevé

Moelle osseuse	Milieu	Concentration, %	Nombre d'expériences	Nombre de souris	Survie à 30 jours, %
0			4	53	0
Fraîche	Tyrode	—	4	54	78
Congelée	Sérum de souris 101	—	1	7	0
—	PVP*	7	2	22	0
—	Dextrane	7	2	21	24
—	ASB**	15	2	21	19
—	ASB**	25	1	10	0

* Vinisyl, Abbot Laboratories, North Chicago, Illinois, E. U.

** Albumine sérique bovine, Microbiological Associates, Bethesda, E. U.

Richards et Persidsky (1961) ont cependant trouvé qu'une solution à 10% de polyvinylpyrrolidone de poids moléculaire égal à 30.000, était 4 fois plus active que le glycérol à 15 %. Ils ont utilisé comme critère de survie, l'adhérence des cellules médullaires sur lamelle en culture tissulaire.

II. — Alcools et polyalcools.

Parallèlement à la découverte faite par Rostand (1946) de la résistance des spermatozoïdes de grenouille à —6° C en présence de glycérol, la mise en évidence de l'action protectrice du glycérol sur les spermatozoïdes de poulet congelés à —79° C (Polge et coll., 1949) a donné une nouvelle impulsion aux études effectuées en ce domaine. La protection conférée par le glycérol est un phénomène général, car il a été observé dans de nombreux cas : spermatozoïdes des mammifères (Smith et Polge,

1950), spermatozoïdes de poulet (Polge, 1951), tissu cutané (Billingham, 1954), tissu ovarien (Parkes et Smith, 1953 ; Parkes, 1957), tissu testiculaire (Deanesly, 1954), œufs de mammifères (Deanesly, 1957), érythrocytes (Smith, 1950), amibes (Fulton et Smith, 1953), cultures tissulaires (Rey, 1957 ; Swim et coll., 1958 ; Hauschka et coll., 1959), rate (Barnes et Loutit, 1955), moelle osseuse (Schwartz et coll., 1957; Ferrebee et coll., 1957; Porter et Murray, 1958). Il faut souligner cependant que les conditions optimales de préservation, à savoir la concentration en glycérol, les vitesses de congélation et de décongélation, ainsi que les températures de conservation dépendent de chaque type cellulaire.

Dans le cas de la moelle osseuse, la congélation « lente » ou « rapide » en l'absence de glycérol ou de tout autre composé protecteur, est incapable de conserver la propriété restauratrice des cellules médullaires (voir Tableau 1). La présence de glycérol, même en petite quantité (0,9 %) permet la conservation de la viabilité des cellules médullaires. La concentration optimale de glycérol pour la moelle osseuse de souris soumise à congélation « lente » et décongélation « rapide » est comprise entre 7,5 % et 15 %. A la concentration de 30 %, le glycérol devient toxique pour ces cellules. Le glycérol conserve encore sa propriété protectrice quand les cellules médullaires sont « rapidement » congelées à —30° C. Cette propriété protectrice du glycérol est diminuée par une congélation « rapide » à —70° C ; elle disparaît complètement quand les suspensions cellulaires sont portées directement à —196° C (Bender et coll., 1960 ; Phan et Bender, 1960b). La survie des cellules médullaires est réduite par une congélation « rapide », devenant nulle quand les suspensions cellulaires sont directement immergées dans l'azote liquide. Si la survie est bonne quand les suspensions sont portées directement dans un bain à —30° C, la congélation ainsi faite doit être relativement lente. Quand on emploie des vitesses plus grandes, la concentration optimale de glycérol semble plus réduite : par immersion directe dans un bain à —79° C, elle est de 3,7 %. Quand on porte directement les suspensions cellulaires à —196° C, la survie de ces cellules est trop faible pour permettre la restauration hématopoïétique des souris irradiées (Phan et Bender, 1960b).

TABLEAU 5

Survie des souris irradiées léthalement (900r) injectées avec 10^5 cellules médullaires isologues congelées à différentes vitesses en présence de glycérol

Moelle osseuse	Milieu	Concentration du milieu, %	Nombre d'expériences	Nombre de souris	Survie à 30 jours, %
0	—		19	279	0
Fraîche	Tyrode		19	258	75
Congelée « lentement »	Tyrode		2	21	0
Congelée « lentement »	Glycérol	0,9	1	10	50
		1,8	1	10	50
		3,7	1	10	40
		7,5	1	10	70
		15,0	5	49	88
		30,0	1	10	0
		60,0	1	10	0
Congelée « rapidement » à —30° C	Glycérol	0,9	2	20	25
		1,8	2	20	45
		3,7	2	20	50
		7,5	2	20	50
		15,0	1	10	80
		30,0	1	10	0
		60,0	1	10	0
Congelée « rapidement » à —79° C	Glycérol	0,9	1	10	0
		1,8	1	10	20
		3,7	1	10	50
		7,5	2	20	25
		15,0	2	20	25
		30,0	1	10	0
		60,0	1	10	0
Congelée « rapidement » à —196° C	Glycérol	0,9	2	20	0
		1,8	2	21	0
		3,7	1	10	0
		7,5	1	10	0
		15,0	1	10	0
		30,0	1	10	0
		60,0	1	10	0

D'autres composés possèdent cette action protectrice vis-à-vis de la moelle osseuse de souris. Parmi les alcools, nous pouvons citer l'éthylène glycol, le propylène glycol, la choline ; parmi les glucides, le ribose, le dextrose, le mannose, le saccharose, le lactose (Bender et coll., 1960 ; Phan et Bender, 1960a) (voir Tableau 8). Avec les poly-alcools, la protection optimale est fonction du nombre d'atomes de carbone de la molécule ; elle augmente des tétra-alcools aux hexa-alcools.

TABLEAU 6

Survie des souris irradiées léthalement (900r) et injectées avec 10^6 cellules médullaires congelées en présence de quelques alcools à leur concentration optimale (en mole)

Moelle osseuse	Milieu	Concentration du milieu, M	Nombre d'expériences	Nombre de souris	Survie à 30 jours, (%)
—			14	171	0
Fraîche	Tyrode		14	167	78
Congelée	Choline chlorhydr.	0,05	2	20	75
—	Ethylène glycol	0,3	1	10	45
—	Propylène glycol	0,66	1	10	10
—	Glycérol	1,6	6	64	89
—	i-Erythritol	0,3	3	29	41
—	d-Ribitol	0,4	2	21	67
—	d-Mannitol	0,7	1	10	80
—	d-Sorbitol	0,4-0,8	4	40	85
—	i-Inositol	0,1	2	20	70

Le mécanisme de la protection conférée par le glycérol a été étudié chez les érythrocytes. Il est démontré que l'hémolyse résultant de la congélation et de la décongélation des érythrocytes est due à l'augmentation de la concentration ionique. La zone critique d'hémolyse pour les érythrocytes, comprise entre —3° C et —40° C, est diminuée quand on augmente la quantité de glycérol (jusqu'à 2,5M) ajouté à la suspension globulaire. D'autre part l'hémolyse d'une suspension globulaire congelée augmente avec la concentration initiale en ClNa du milieu (0,1M à 0,6M) ; elle diminue si on augmente parallèlement la concentration en glycérol. La concentration en ClNa de la phase liquide d'une solution isotonique congelée devient critique pour les érythrocytes quand elle atteint 0,8M ; ceci est indépendant de la température et de la concentration en glycérol (Lovelock, 1953a, b ; 1954a). Il résulte de ces études que l'hémolyse des érythrocytes est causée par l'augmentation de la concentration ionique. L'addition de glycérol protège les érythrocytes en diminuant la concentration des composés minéraux. Cette propriété n'est pas spécifique au glycérol, mais est commune à beaucoup de composés organiques. Pour pouvoir protéger les érythrocytes soumis à congélation et décongélation, un composé organique doit posséder les qualités suivantes : être soluble dans les solutions aqueuses salines, pénétrer aisément dans la cellule, être non toxique pour la cellule et avoir un poids moléculaire faible. La concentration de ce corps pour une protection optimale est alors proportionnelle à son poids moléculaire (Lovelock, 1954b).

Il découle des propriétés colligatives des solutions que la simple addition d'un composé organique atoxique à une solution d'électrolytes, abaissera la concentration saline en équilibre avec les cristaux de glace, à toute température en dessous du point de congélation. Il est donc possible de maintenir à toute température la concentration en électrolytes au dessous du niveau critique par addition d'une quantité suffisante de composé organique atoxique.

La concentration approximative de composé organique requis peut se calculer ainsi : l'abaissement du point de congélation Δt d'une solution aqueuse de ClNa contenant un composé organique neutre est $\Delta t = k (2x+y)$.

où x et y sont les concentrations respectives de ClNa et de composé organique. Si les concentrations x et y sont exprimées en unités ou fractions molaires, k est une constante qui indique l'abaissement observé du point de congélation d'une solution aqueuse par unité de concentration de composé organique.

Durant la congélation les cristaux de glace se séparent et la concentration en électrolyte et en composé organique augmente dans la même proportion. Si la concentration en ClNa au-dessus de laquelle la cellule est irréversiblement atteinte est n fois la concentration initiale en ClNa x, l'abaissement de température au-dessous de 0° C à laquelle la cellule sera atteinte est :

$$\Delta\, {}^{t}D = kn\,(2x+y)$$

La concentration de soluté requis pour prévenir une atteinte cellulaire irréversible à une température donnée doit être supérieure à y.

$$y = \frac{\Delta\, {}^{t}D - 2knx}{kn}$$

La concentration de glycérol requise en pratique pour prévenir une atteinte cellulaire a été comparée avec celle calculée par la théorie. Les cellules étudiées furent les spermatozoïdes de lapin et de taureau ainsi que les érythrocytes humains. La correspondance étroite entre la théorie et les résultats de l'expérimentation, est une preuve en faveur de la théorie suivant laquelle le glycérol protège les cellules vivantes soumises à congélation par ses propriétés de tampon électrolytique (Lovelock, 1954b).

Rey (1957a, 1960) a démontré le rôle du glycérol au cours des premières étapes du refroidissement (0 à —20° C) dans le ralentissement de la cristallisation, la diminution de la taille des cristaux formés, l'abaissement de la température de cristallisation commençante et la prévention du choc osmotique par dilution des solutions salines concentrées. Aux températures intermédiaires (—20 à —80° C), le glycérol régularise l'ensemble du processus de cristallisation et le rend reversible, en supprimant les phénomènes eutectiques dus aux mélanges salins.

Si la supériorité du glycérol dans la conservation des érythrocytes n'est pas mise en doute, il n'en est pas de

TABLEAU 7

Survie des souris exposées à une dose léthale de rayons X (900r) et injectées avec 10^5 cellules médullaires congelées en présence de quelques oses et polyalcools dérivés à différentes concentrations (en mole)

Moelle osseuse	Milieu		Nombre d'expériences	Nombre de souris	Test de Schreck (cellules vivantes, %)	Survie à 30 jours, %
0			19	227	—	0
Fraîche	Tyrode		19	247	84	85
Congelée	Tyrode		2	21	0	0
—	Glycérol	0,2 M	1	10	37	50
		0,4 M	1	10	20	40
		0,8 M	1	10	35	70
		1,6 M (15%)	6	64	34	89
—	d - Glycéraldéhyde	0,2 M	1	10	6	0
		0,4 M	1	10	3	0
		0,8 M	1	19	1	0
		1,6 M	1	19	1	0
—	d - Ribitol	0,2 M	2	14	19	43
		0,4 M	2	21	10	67
		0,8 M	2	25	2	12
—	d - Ribose	0,2 M	1	20	18	85
		0,4 M	1	20	9	65
		0,8 M	1	20	4	95
—	d - Sorbitol	0,2 M	2	20	30	75
		0,4 M	2	20	18	85
		0,8 M	2	20	4	85
—	Dextrose	0,2 M	1	10	31	0
		0,4 M	1	20	11	15
		0,8 M	1	20	8	10
—	d- Mannitol	0,3 M	1	10	43	70
		0,5 M	1	10	38	50
		0,7 M	1	10	26	80
—	d -Mannose	0,3 M	1	20	7	25
		0,5 M	1	20	6	15
		0,7 M	1	20	2	10

même avec les cellules médullaires de souris ou d'autres polyalcools comme le d-mannitol et le d-sorbitol sont d'excellents protecteurs (Bessis et coll., 1960).

Ashwood-Smith (1961a, b ; 1962a, b) a récemment montré le rôle du diméthylsulfoxyde dans la conservation de la moelle osseuse à —79° C. Ce produit permettrait une meilleure protection que le glycérol puisque la réhydratation chez la souris irradiée est plus rapide. Indiquant ainsi qu'un plus grand nombre de cellules souches étaient préservées durant la congélation. Ceci a d'ailleurs été confirmé par l'examen des cellules médullaires colorées par l'acridine orange, vues microscope à fluorescence en lumière ultra-violette.

III. — Oses et Osides.

La structure uniquement alcoolique n'est pas nécessaire à un composé destiné à protéger les cellules médullaires au cours de congélation. Les dérivés d'oxydation de ces produits qui résultent de l'oxydation de la fonction alcool primaire au carbone 1 en fonction aldéhyde sont

TABLEAU 8

Survie des souris irradiées léthalement (900r) et injectées avec 10⁷ cellules médullaires congelées en présence de quelques glucides à leur concentration optimale (en mole)

Moelle osseuse	Milieu	Concentration du milieu, M	Nombre d'expériences	Nombre de souris	Survie à 30 jours (%)
—			10	121	0
Fraîche	Tyrode		10	100	73
Congelée	α-D-Ribose	0,6	1	20	95
—	D-Arabose	0,4	1	20	85
—	α-D-Mannose	0,3	1	20	25
—	Saccharose	0,2	2	20	50
—	α-D-Lactose	0,5	1	10	70

des produits de choix, car ils sont susceptibles de donner des solutions concentrées dont le pH reste au voisinage de la neutralité. Une meilleure protection est généralement obtenue avec les polyalcools (glycérol, sorbitol, mannitol), mais les oses dérivés sont parfois, comme c'est le cas pour le ribose, beaucoup plus actifs. Il faut cependant souligner que les composés organiques employés ainsi que leur concentration optimale, diffèrent dans leur activité suivant les types cellulaires (Phan et Bender, 1960b).

IV. — Acides aminés.

Les acides aminés, dont la plupart sont des constituants cellulaires normaux, forment un groupe de composés dont la structure chimique varie largement. Certains sont neutres et solubles dans une solution aqueuse saline. Pour ces raisons, ce sont des composés particulièrement intéressants pour une investigation des relations existant entre la structure chimique et l'activité protectrice.

Seize acides aminés et un produit dérivé (2-mercaptoéthylguanidine, MEG) ont été essayés à 6 concentrations différentes. Les résultats pour les composés qui possèdent une activité protectrice sont présentés au tableau 9. Par contre les substances suivantes : l-cystéine, l-asparagine, l-lysine, l-arginine, 2-mercaptoéthylguanidine ont été trouvées dénuées de tout effet protecteur.

Si on compare l'hémolyse des érythrocytes de mammifères avec la perte de viabilité des cellules médullaires de souris, les résultats de nos expériences avec les solutions d'acides-aminés sont en contradiction avec la théorie de Lovelock. Son hypothèse n'est plus applicable aux cellules médullaires de souris où la multiplication cellulaire est le critère de survie. Pourtant les acides aminés sont des composés organiques non toxiques (à ces concentrations), qui peuvent pénétrer dans la cellule. Un certain nombre d'entre eux montrent une activité protectrice. Parmi les composés protecteurs, il n'y a pas de relation simple entre la concentration optimale du composé et son poids moléculaire (Phan et Bender, 1960c).

TABLEAU 9

Survie des souris irradiées léthalement (900r) injectées avec 10^6 cellules médullaires congelées en présence d'acides aminés à différentes concentrations (en mole)

Moelle osseuse	Acide Aminé	Concentration M	Nombre de souris	Survie à 30 jours, %
0			206	0
Fraîche	Tyrode		278	74
Congelée	l-Glycine	0,006	20	55
		0,013	20	45
		0,025	20	15
		0,050	20	20
		0,100	20	50
		0,200	20	5
Congelée	l-Alanine	0,006	20	35
		0,013	20	60
		0,025	20	55
		0,050	20	55
		0,100	20	35
		0,200	20	0
Congelée	l-Sérine	0,006	20	0
		0,013	20	0
		0,025	20	0
		0,050	20	25
		0,100	20	35
		0,200	20	0
Congelée	l-Valine	0,006	20	0
		0,013	20	20
		0,025	20	10
		0,050	20	10
		0,100	20	0
		0,200	20	0
Congelée	l-Leucine	0,006	20	30
		0,013	20	0
		0,025	20	0
		0,050	20	5
		0,100	20	0
		0,200*	—	—

* insoluble

Moelle osseuse	Acide Aminé	Concentration M	Nombre de souris	Survie à 30 jours, %
Congelée	l - Méthionine	0,006	15	27
		0,013	15	27
		0,025	15	7
		0,050	15	0
		0,100	15	0
		0,200	15	0
Congelée	l - Glutamine	0,006	12	0
		0,013	12	0
		0,025	12	0
		0,050	12	17
		0,100	12	0
		0,200	12	0
Congelée	l - Proline	0,006	15	7
		0,013	15	7
		0,025	15	7
		0,050	15	47
		0,100	15	0
		0,200	15	0
Congelée	l - Histidine	0,006	11	18
		0,013	12	17
		0,025	12	0
		0,050	12	8
		0,100	12	17
		0,200	12	8
Congelée	l - Trypto-phane	0,006	20	15
		0,013	20	0
		0,025	20	0
		0,050	20	0
		0,100	20	0
		0,200*	—	—
Congelée	l - Phénylala-nine	0,006	20	20
		0,013	20	15
		0,025	20	0
		0,050	28	0
		0,100	20	0
		0,200	12	0
Congelée	l - Tyrosine	0,006	20	15
		0,013	20	0
		0,025*	—	—

Chapitre IV

ACTION DES COMPOSES MINERAUX SUR LA SURVIE DES CELLULES MEDULLAIRES SOUMISES A CONGELATION

Certains travaux sont orientés dans le sens qu'une déshydratation de la cellule avant la congélation est nécessaire pour préserver sa viabilité. Ainsi 20 % des spermatozoïdes de grenouille survivent à une congélation rapide à la température de l'air liquide, quand ils sont traités au préalable par une solution M de saccharose (Luyet et Hodapp, 1938). D'autres expériences montrent que divers tissus embryonnaires de poulet survivent à congélation et décongélation rapides quand ils ont été au préalable traités par une solution d'éthylène glycol à 30 % (Luyet, 1952).

Cependant la déshydratation est généralement néfaste aux cellules de mammifères. Ainsi les ovaires desséchés *in vitro* à 60 % de leur contenu d'eau, ne peuvent plus se greffer (Lipschütz, 1929). Les fibres musculaires de grenouille perdent irréversiblement leur propriété contractile après deshydratation à plus de 78 % de leur contenu d'eau (Moran, 1929). Les tissus cutanés ne peuvent plus être greffés après lyophilisation à plus de 75 % (Billingham et Medawar, 1952b).

Les travaux de l'école de Luyet ont pour base théorique le principe de la vitrification de tout fluide, par congélation ultra-rapide aux températures de l'air liquide (Tamman, 1898), Luyet a réussi par cette technique à préserver la viabilité de certains tissus et cellules comme fibres musculaires, muscle amniotique de poulet, cœur d'embryon de poulet, érythrocytes et spermatozoïdes de grenouille. Selon cet auteur la mort cellulaire serait le

résultat de la cristallisation des constituants de la cellule à leur point de congélation. Le réarrangement moléculaire inhérent à cette cristallisation serait responsable de la dénaturation des protéines, des lécithines et autres composés nécessaires à la vie de la cellule. Par contre, la vitrification obtenue par congélation ultra-rapide conserverait la structure moléculaire originelle de ces composés et préserverait ainsi la viabilité de la cellule (Luyet, 1952). Cependant, il faut souligner que cette méthode ne permet de conserver les cellules qu'en petite quantité et en couche très mince. L'utilisation de la congélation ultra-rapide afin de prévenir la formation des cristaux de glace est basée sur le principe que les molécules d'eau passeraient de l'état liquide à l'état vitreux sans cristalliser.

Rey (1960) par une méthode d'analyse thermique différentielle des systèmes biologiques préalablement trempés dans l'azote liquide et réchauffés progressivement, a mis en évidence l'influence déterminante du glycérol sur l'ensemble des propriétés physico-chimiques des tissus à basses températures. Au-dessus de —130° C et pour des concentrations moyennes de glycérol (30 %), apparaissent des phénomènes de transformation vitreuse suivis de dévitrification; pour des concentrations plus élevées en glycérol (50 %), un réchauffement lent s'accompagne toujours d'une cristallisation brutale, susceptible de provoquer une altération irréversible de la cellule.

Durant longtemps on admettait qu'une des causes possibles de la mort cellulaire durant la congélation était la formation de cristaux aigus de glace qui perceraient la membrane de la cellule. Ceci n'a pas été confirmé et il semble que la membrane cellulaire intacte servirait plutôt de barrière à ces cristaux de glace. A basse température le milieu extérieur à la cellule congèle, alors que le protoplasme cellulaire reste à l'état liquide (Meryman, 1957). La congélation interne ne se fait qu'après inoculation de cristaux de glace ou après une longue période de surfusion (Smith et coll., 1951).

On admettait aussi que la destruction de la cellule au cours de la congélation pouvait être le résultat de son écrasement entre les faces adjacentes des cristaux de glace. Cependant il est montré que les érythrocytes congelés à —20° C en présence de glycérol sont capables de

migrer et de déposer au fond des tubes. A cette température il faut donc considérer la suspension congelée comme un feutrage de cristaux péricellulaires entourant des veines liquides dans lesquelles les cellules pourraient se déplacer (Sloviter, 1951).

La cristallisation de l'eau est cependant une cause beaucoup plus évidente de la mort cellulaire. Quand la congélation apparaît dans le protoplasme d'amibe ou de fibres musculaires de grenouille, ces cellules sont irréversiblement tuées (Chambers et Hale, 1932).

Les spermatides polynucléés congélés en présence de glycérol ne présentent pas de signes décelables de cristallisation interne à —80° C; après décongélation ces spermatides, qui gardent la même morphologie, reprennent leur motilité. En l'absence de glycérol ces cellules congelent entre —5° C et —20° C; après décongélation elles perdent irréversiblement leur motilité (Smith et Smiles, 1953).

Il est possible que la formation des cristaux de glace à l'intérieur du protoplasme conduise à la rupture des systèmes colloïdaux (Stiles, 1930). Une autre cause plus probable de cette action néfaste proviendrait de l'augmentation de la concentration ionique, elle-même responsable de la dissolution, de la précipitation et de la dénaturation des protéines et des lipides de la cellule (Lovelock, 1954a).

La cause principale de la mort de la cellule soumise à congélation et décongélation semble donc être le résultat du traumatisme osmotique infligé à la cellule, mais on ne peut exclure que d'autres facteurs (choc thermique, déshydratation trop poussée de la cellule, cristallisation du protoplasme) viennent s'ajouter à cet effet.

C'est dans le but de vérifier l'hypothèse de Lovelock que nous avons essayé divers composés minéraux. Si la congélation en présence de ClNa (0,154M) ou dans un soluté de Tyrode ne permet pas de préserver la viabilité des cellules médullaires, il n'en est pas de même d'autres sels sodiques essayés. Des 7 composés étudiés à 8 concentrations différentes, INa, BrNa, NO_3Na, SO_4Na_2, SO_3Na_2, SCNNa donnent une excellente protection à certaines concentrations, tandis que NO_2Na donne un moins bon résultat. Les résultats obtenus suggèrent l'existence

de deux concentrations optimales de protection. Ainsi, pour SCNNa, la survie des souris irradiées léthalement est obtenue entre 0,003M et 0,013 M et entre 0,2M et 0,4M mais pas aux concentrations intermédiaires. Quoique les résultats ne soient pas assez abondants pour établir une

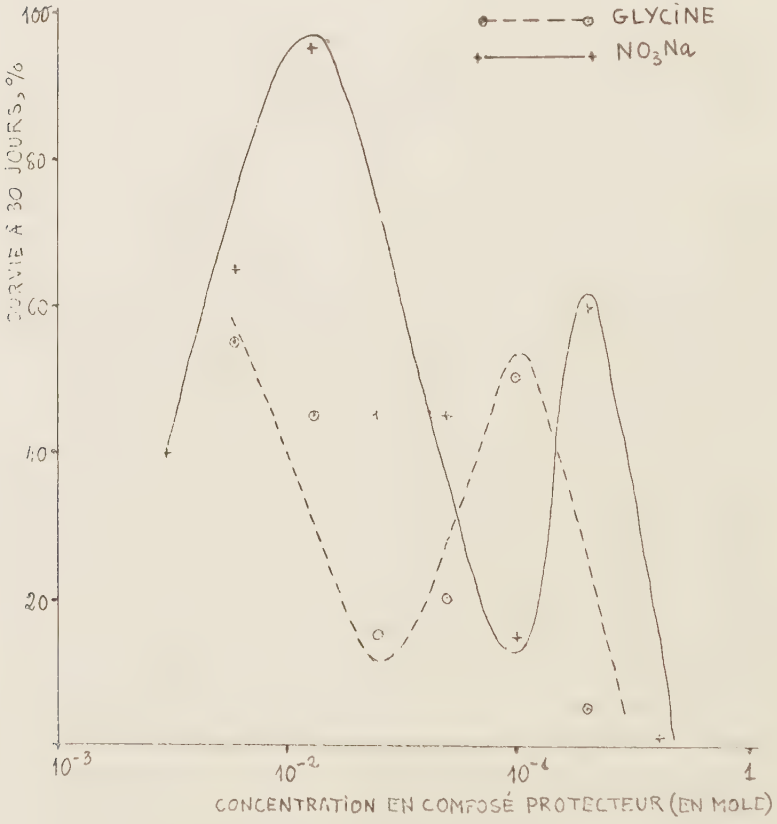

Fig. III. — Survie des souris (C57BLx101) F_1 léthalement irradiées traitées avec des cellules médullairese congelées en présence de composé protecteur

courbe bimodale concentration-protection, le fait que tous les composés essayés montrent plus ou moins ce phénomène, semble significatif. Cet effet avait été déjà observé antérieurement avec les composés organiques. Sa signification demeure cependant obscure. (PHAN et BENDER, 1960d).

Il est difficile d'expliquer la protection conférée par les composés minéraux. Elle ne peut évidemment pas être attribuée à un abaissement de la concentration en électrolytes durant la congélation (Lovelock, 1953b; 1954b). Elle n'est pas le résultat de la vitrification de la cellule, ainsi que le suggère Luyet (1952), car nous avons employé la congélation « lente » au cours de ces expériences. Une étude plus approfondie, de préférence sur les cellules isolées, pourra aider à expliquer le phénomène.

TABLEAU 10

Survie des souris irradiées léthalement (900r) et injectées avec 10^6 cellules médullaires congelées en présence de sels minéraux à différentes concentrations (en mole)

Moelle osseuse	Milieu	Concentration* M	Nombre de souris	Cellules éosine-négatives, %	Survie à 30 jours, %
0			210		0
Fraîche	Tyrode		288	84	75
Congelée	ClNa	0,154	81	3	0
Congelée	Tyrode		58	5	0
Congelée	INa	0,003	18	11	6
		0,006	18	11	6
		0,013	18	19	0
		0,025	20	35	50
		0,05	20	23	35
		0,1	20	3	10
		0,2	23	2	0
		0,4	20	0	0
Congelée	BrNa	0,003	16	5	25
		0,006	20	16	55
		0,013	20	9	40
		0,025	20	6	45
		0,05	20	4	40
		0,1	20	1	25
		0,2	20	2	35
		0,4	20	1	0

* dans une soluté de ClNa 0,154 M à 3,5 % polyvinylipyrrolidone.

Moelle osseuse	Milieu	Concentration* M	Nombre de souris	Cellules éosine-négatives ,%	Survie à 30 jours, %
Congelée	NO_3Na	0,003	20	19	40
		0,006	20	14	65
		0,013	20	12	95
		0,025	20	13	45
		0,05	20	17	45
		0,1	20	9	15
		0,2	22	3	59
		0,4	20	0	0
Congelée	NO_2Na	0,003	20	7	5
		0,006	20	11	0
		0,013	20	10	0
		0,025	20	7	0
		0,05	20	12	5
		0,1	20	9	0
		0,2	20	5	0
		0,4	20	2	0
Congelée	SO_4Na_2	0,003	20	6	60
		0,006	20	2	0
		0,013	20	1	50
		0,025	20	1	5
		0,05	20	7	15
		0,1	20	5	0
		0,2	20	2	5
		0,4	20	0	0
Congelée	SCNNa	0,003	20	13	30
		0,006	20	15	40
		0,013	20	10	5
		0,025	20	9	0
		0,05	20	6	0
		0,1	20	1	0
		0,2	20	0	5
		0,4	20	0	5
Congelée	$S_2O_3Na_2$	0,003	20	2	15
		0,006	20	4	0
		0,013	20	3	30
		0,025	20	3	25
		0,05	20	5	20
		0,1	20	6	35
		0,2	20	16	5
		0,4	20	2	0

Chapitre V

DUREE DE CONSERVATION DE LA MOELLE OSSEUSE CONGELEE

On s'est demandé si la vie de la cellule était fortement ralentie ou suspendue aux basses températures. Becquerel (1951), en utilisant la loi de Vant' Hoff (7) sur la diminution de la vitesse de dissociation moléculaire en fonction de la température, trouve que cette vitesse, qui conditionne les réactions chimiques du protoplasme cellulaire, diminue de moitié quand la température baisse de 10° C. Vers —100° C, cette vitesse de réaction serait 85.300 fois plus lente qu'à 20° C; à —200° C, elle serait 8.150.000 fois ; à —250° C, 4.850.000.000 fois ; à —270° C, 71.300.000.000.000 fois plus lente et à —273° C elle serait nulle. La vie de la cellule serait ainsi suspendue.

La survie prolongée de la moelle osseuse congelée de souris a été vérifiée à ces trois températures : —30° C, —79° C, —196° C.

Au point de vue de la survie *in vivo* de ces cellules, nous avons remarqué que la moelle conservée à —79° C et —196° C gardait intact son pouvoir de multiplication après un an, alors que les cellules conservées à —30° C avaient perdu toute activité restauratrice après six mois.

Au point de vue cytologique, s'il y a une faible perte cellulaire à —196° C, la lyse cellulaire à —30° C et —79° C est relativement forte.

---

(7)

$$\frac{d(\ln K)}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2}$$

K, constante d'équilibre (K = 5750)
T, température absolue
Δ H, chaleur de réaction
R, constante des gaz parfaits

Le nombre N de cellules conservées à la température T durant la période t, est donnée par la relation suivante : $N = A - Kt$ (1) où A est une constante et K le coefficient de conservation.

TABLEAU 11

Survie des souris irradiées léthalement (900r) et injectées avec 10^6 cellules médullaires congelées en présence de 15 % glycérol et conservées durant différentes périodes

Température de conservation	Durée de conservation	Nombre d'expériences	Nombre de souris	Nombre de cellule/ml (x 10^6)	Survie à 30 jours, %
Pas de moelle osseuse		17	268	—	0
Moelle osseuse fraîche		17	271		82
—30° C	1 heure	1	15	18,5	100
	1 semaine	2	41	17,5	66
	4 semaines	2	45	10,8	60
	25 semaines	1	25	9,3*	0
	52 semaines	1	11	2,1*	0
—79° C	1 heure	1	14	20,0	93
	1 semaine	1	27	18,6	82
	4 semaines	1	27	14,2	70
	22 semaines	1	25	6,3	80
	48 semaines	1	28	1,8	64
	126 semaines	1	30	—	0
—196° C	1 heure	6	64	19,7	89
	1 semaine	2	52	18,3	58
	4 semaines	2	44	18,5	77
	22 semaines	1	25	16,5	72
	48 semaines	1	40	16,8	48
	126 semaines	1	29	—	76

* cellules agglutinées en totalité

De plus, nous avons noté expérimentalement une variation régulière du coefficient de conservation K en fonction de la température T : pour les valeurs de T respectivement égales à —30, —79, —196° C, K est égal à 0,054; 0,018; 0,002. Nous n'avons pas tenu compte, dans l'établissement de la relation (1), de la présence des cellules mé-

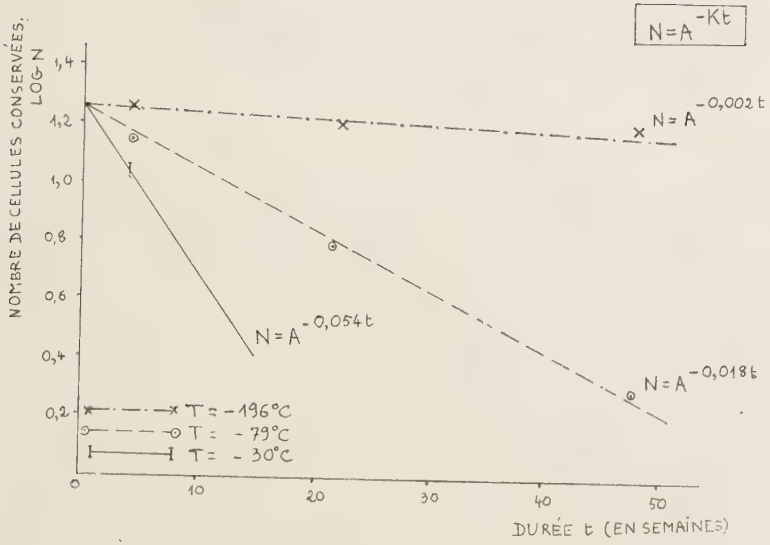

Fig. IV. — Diminution du nombre des cellules médullaires conservées à différentes températures, en fonction de la durée de conservation

dullaires conservées à —30° C après 25 semaines, car ces cellules étaient toutes agglutinées et éosine-positives.

Le test de Schrek n'a été d'aucune utilité car il ne permet pas d'évaluer avec précision l'efficacité restauratrice d'une suspension de cellules médullaires. Il n'existe pas une relation entre le pourcentage de cellules vivantes indiquées par ce test et la survie des souris léthalement irradiées traitées. Ce manque de corrélation n'infirme pas la capacité de la technique de séparer les cellules vivantes des cellules tuées, mais est le résultat de la mort sélective de certaines lignées de cellules. Nous pensons que la restauration est réalisée par certaines lignées de cellules présentes en petite quantité dans la moelle osseuse, à savoir les cellules souches qui sont capables de repeupler les espaces hématopoïétiques. Les autres lignées de cellules qui limitent dans notre cas la signification du test de Schrek, sont probablement de peu d'importance dans la prévention de la mort hématologique (Phan et Bender, 1960b).

Le traumatisme osmotique, qui semble être le principal facteur de l'inactivation de la cellule soumise à con-

gélation, tue la cellule probablement par : dissolution des lipoprotéines (Moran, 1925), dénaturation des protéines (Finn, 1932), rupture des cénapses lipido-protidiques (Lovelock, 1957).

Le choix de la température est un facteur important pour une conservation prolongée de la vie cellulaire. Contrairement à ce qu'on pensait, le métabolisme cellulaire se maintient aux températures inférieures au point de congélation. Ainsi diverses espèces de bactéries, levures et moisissures survivent et se multiplient à —9° C, température à laquelle le milieu se trouve à l'état congelé (Smart, 1935). L'activité de divers enzymes se poursuit à basses températures : ainsi la lipase reste active à —24,5° C, la digestion trypsique continue à —15° C et l'invertase peut hydrolyser le saccharose à —18° C (Sizer et Josephson, 1942). Durant la congélation de la cellule, il y a diminution mais non cessation de l'activité enzymatique. D'autre part, la diminution de cette activité varie suivant les enzymes (Joslyn, 1951) et cette différence est à l'origine d'un déséquilibre dans les cycles de réactions biochimiques du métabolisme cellulaire, qui peut aboutir à l'accumulation de produits toxiques (Joslyn, 1949). Il se peut aussi que l'équilibre normal de la cellule avec son milieu ambiant soit rompu durant la congélation; les changements de perméabilité de la membrane cellulaire pourraient ainsi causer une accumulation de produits toxiques dans la cellule.

Les températures voisines du point de congélation ne sont pas favorables à la conservation prolongée de la cellule. Il est démontré que les érythrocytes ne peuvent être conservés pendant longtemps entre 0° C et —40° C (Smith, 1954). La moelle osseuse maintenue à —30° C perd son efficacité restauratrice après six mois alors qu'elle la conserve encore après un an à —79° C et —196° C (Bender et coll., 1960). Il en est de même pour les spermatozoïdes de taureau congelés à —79° C (Polge et Rowson, 1953) et le tissu ovarien à —196° C (Parkes et Smith, 1953) qui conservent leur viabilité après un an. Certaines lignées de cultures tissulaires se conservent intactes après deux ans à —79° C (Swim et coll., 1958; Hauschka et coll., 1959). Comme il est rapporté dans le tableau 11, la moelle osseuse conservée à —196° C possède encore sa propriété

restauratrice après 126 semaines; la survie des souris léthalement irradiées, injectées avec ces cellules, atteint 75 %. Dans les mêmes conditions expérimentales, la moelle osseuse conservée à —79° C s'est révélée dénuée de tout effet protecteur.

Les températures optimales de préservation des cellules animales sont donc les températures les plus basses, probablement celles inférieures à —80° C. Il s'agit de diminuer au maximum le métabolisme de la cellule; mais même à ces températures il est probable que la détérioration de la cellule se poursuit, quoiqu'à vitesse réduite (Becquerel, 1951).

Etudiant la résistivité des solutions congelées, Rey (1960) a d'ailleurs montré que la cristallisation des mélanges eutectiques se fait au voisinage de —80° C, limite à partir de laquelle les systèmes biologiques se présentent à l'état solide. Ces systèmes cependant sont susceptibles d'évoluer, au cours d'un refroidissement ultérieur, sous l'action de véritables réactions en milieu solide, capables d'altérer profondément l'infrastructure de la cellule.

Chapitre VI

CULTURE « IN VITRO » DE CELLULES ANIMALES CONGELEES

Il serait préférable d'étudier la survie cellulaire sur une population homogène de cellules. Certains auteurs avaient déjà essayé d'obtenir une colonie homogène de cellules animales à partir d'une cellule souche (Rous et Jones, 1916). Ce fut grâce à l'école de Puck, qui utilisa des milieux synthétiques de composition constante, que purent être réalisés les progrès permettant la culture de la cellule animale isolée (Puck et coll., 1954; Puck, 1959).

I. Technique de Puck, modifiée par Phan et Bender.

C'est une technique d'isolement de la cellule animale par des dilutions successives. Les cellules isolées placées dans des milieux nutritifs appropriés donnent, par multiplication, de petites colonies visibles à l'œil nu, à l'instar de colonies bactériennes. Nous avons utilisé comme type cellulaire une souche « épithélioïque » (Puck, 1959) de Girardi Heart (clone 7A6), qui fut isolée, par nos soins, du cœur d'un adulte normal. Ces cellules forment des colonies denses avec des bords bien définis et relativement lisses.

Le milieu de culture employé fut le milieu n° 199 de Morgan, Morton et Parker (8) (1950) additionné de 20 % de sérum humain de type AB, rhésus positif et contenant 50 U.I. de pénicilline G et 0,5 mg de streptomycine par ml (milieu de croissance). L'appareillage employé a été stérilisé par les procédés habituellement employés en culture tissulaire : stérilisation à l'autoclave des milieux nutritifs et stérilisation à la chaleur sèche de la verrerie.

(8) *Milieu n° 199 de Morgan, Morton, Parker* (1950)

	mg/l
dl-tryptophane	20
dl-phénylalanine	50
dl-isoleucine	40
dl-leucine	120
dl-méthionine	30
dl-sérine	50
dl-thréonine	60
dl-valine	50
dl-alanine	50
l-proline	40
l-hydroxyproline	10
acide aminoacétique	50
l-arginine	70
l-histidine	20
l-lysine	70
acétate de sodium	50
acide dl-aspartique	60
acide dl-glutamique	150
l-tyrosine	40
l-cystine	20
adénine	10
guanine	0,30
cystéine	10
xanthine	0,30
hypoxanthine	0,30
thymine	0,30
uracile	0,30
vitamine A	10
calciférol	0,10
cholestérol	0,20
ménadione	0,01
phosphate tocophérol	0,01

	mg/l
acide nicotinique	0,025
amide nicotinique	0,025
pyridoxal	0,025
pyridoxine	0,025
thiamine	0,010
riboflavine	0,010
pantothénate de calcium	0,010
i-inositol	0,050
acide p-aminobenzoique	0,050
choline	0,50
d-biotine	0,01
acide folique	0,01
acide l-ascorbique	5,0
glutathion	5,0
d-ribose	0,50
acide adénylique	0,20
adénosine triphosphate	0,010
l-glutamine	100
nitrate ferrique	0,10

	g/l
ClNa	8,00
ClK	0,40
Cl_2Ca	0,14
SO_4Mg, 7 H_2O	0,10
Cl_2Mg, 6 H_2O	0,10
PO_4HNa_2, 2 H_2O	0,06
PO_4H_2K	0,06
glucose	1,00
rouge de phénol	0,02
CO_3HNa	1,25

(9) *Soluté de Hanks* (1949)

	g/l
ClNa	8,00
ClK	0,40
Cl_2Ca	0,14
SO_4Mg, 7 H_2O	0,10
Cl_2Mg, 6 H_2O	0,10
PO_4 HNa_2, 2 H_2O	0,06
PO_4 H_2K	0,06
glucose	1,00
CO_3HNa	0,35
rouge de phénol	0,02

(10) *Soluté A de Puck à 0,05 % trypsine* (1956)

	g/l
ClNa	8,00
ClK	0,40
glucose	1,00
CO_3HNa	0,35
rouge de phénol	0,0012
trypsine	0,500

Les cellules souches de Girardi Heart sont maintenues dans des erlenmeyers de 125 ml en présence du milieu n° 199 de Morgan, Morton et Parker additionné de 10 % de sérum humain de type AB, rhésus positif (milieu de survie). On rejette le milieu au moment de l'utilisation et on rince la couche cellulaire avec la solution de Hanks (9). On ajoute alors la solution A de Puck à 0,05 % de trypsine (10), de façon à recouvrir entièrement les cellules. L'erlenmeyer est ensuite porté dans un bain à 37° C pendant 5-10 minutes et agité doucement. On dilue ensuite la solution par l'addition d'un égal volume de milieu n° 199. On mélange la suspension cellulaire par pipetage répété afin d'obtenir une dispersion complète des amas cellulaires. Les techniques de congélation furent les mêmes que celles employées pour la moelle osseuse; chaque expérience comporte, à côté de divers essais, une série de contrôle (cellules n'ayant subi aucun traitement). Après décongélation, la suspension est comptée à l'hémocytomètre, ensuite ensemencée dans des boîtes de Pétri de 5 cm de diamètre. Incubation continue pendant 10 jours dans une atmosphère à 37° C, 5 % CO_2 et 90° hygrométriques. Les cellules tombent et se fixent sur les boîtes de Pétri; elles se multiplient et donnent naissance à des colonies. Cette technique est parfaitement adaptée à une étude quantitative, car de chaque cellule survivante dérive une colonie cellulaire.

Au bout de 10 jours d'incubation, on rejette le milieu et on colore les colonies avec le colorant de Giemsa (11). La numération des colonies se fait à la loupe binoculaire.

II. Résultats.

Les résultats que nous avons obtenus sur des cellules animales isolées confirment dans les grandes lignes ceux obtenus au moyen de la greffe de moelle osseuse isologue.

La congélation « lente » s'est révélée la moins nocive pour la survie de la souche épithélioïque de Girardi Heart (clone 7A6). En l'absence de tout composé protecteur, la survie cellulaire tombe de 4,1 % quand on emploie la congélation « lente », à 0,2 % quand on emploie

(11) Solution méthylique d'éosine et d'azur II de méthylène.

TABLEAU 12

Survie *in vitro de* GIRARDI HEART (Clone 7A 6) soumise à différentes techniques de congélation

Technique de congélation	Milieu	Nombre de cellules ensemencées	Multiplication clonique des essais, %	Multiplication clonique des témoins, %	Survie celiulaire*, %
« Lente »	199 + 20 % SH***	2500	0,76	18,4	4,1
	199 + 20 % SH + mannitol (0,7M)	2500	2,44	18,4	13,3
	199 + 20 % SH + 15 % glycérol (1,6M)	3400	21,5	25,6	84,0
« Rapide » à —30° C	199 + 20 % SH	2500	1,32	18,4	7,2
	199 + 20 % SH + mannitol (0,7M)	2500	1,96	18,4	10,7
	199 + 20 % SH + 15 % glycérol (1,6M)	2000**	13,4	73.6	18,2
« Rapide » à —79° C	199 + 20 % SH	2500	0,04	18,4	0,2
	199 + 20 % SH + mannitol (0,7M)	2500	0,36	18,4	2,0
	199 + 20 % SH + 15 % glycérol (1,6M)	650	8,4	39.4	21,2
« Rapide » à —196° C	199 + 20 % SH	2500	0.0	18,4	0,0
	199 + 20 % SH + mannitol (0,7M)	2500	0,44	18,4	2,4
	199 + 20 % SH + 15 % glycérol (1,6M)	350	1,5	54,1	2,8

* $\frac{\text{Multiplication clonique des essais} \times 100}{\text{Multiplication clonique des témoins}}$

** Souche épithélioïque de Hela (clone S3).

*** Sérum humain.

la congélation « rapide » à —79° C. Elle devient nulle quand on porte les cellules directement à —196° C. Par contre, la survie cellulaire est excellente lorsqu'on utilise la congélation « rapide » à —30° C. Les résultats obtenus cadrent avec les expériences de transplantation de moelle osseuse (*voir tableau 1*).

Si on emploie les mêmes techniques de congélation, on peut remarquer que l'addition de composés protecteurs augmente la survie cellulaire. Cette augmentation, si elle est faible pour le mannitol, est importante pour le glycérol où elle atteint les mêmes valeurs que celles obtenues lors de nos expériences de transplantation de moelle osseuse isologue chez la souris (*voir tableau 5*).

La technique de culture tissulaire utilisée pourra aider à élucider le mécanisme de la survie cellulaire aux basses températures. Cette technique quantitative donne des résultats constants et pourra être employée avec fruit dans l'étude de la protection conférée par les composés organiques ou minéraux atoxiques à la cellule animale congelée.

CONCLUSIONS

Nous avons étudié la survie cellulaire aux basses températures au moyen d'une technique de transplantation de cellules médullaires isologues chez la souris léthalement irradiée. On considère la survie des souris irradiées injectées avec une suspension de cellules médullaires, comme critère de la viabilité et de la multiplication de ces cellules. Au cours de cette étude, nous avons plus particulièrement mis en évidence certains aspects de ce problème.

1. La congélation « lente » ne peut préserver la viabilité de la moelle osseuse en l'absence de tout composé protecteur. En présence de glycérol les cellules médullaires se conservent mieux quand elles sont soumises à congélation « lente ». Une congélation « rapide » à —79° C réduit de 70 % l'efficacité restauratrice de ces cellules; leur pouvoir restaurateur est complètement détruit quand ces cellules sont directement congelées à —196° C.

2. La décongélation « rapide » à 37° C s'est révélée moins nocive pour la moelle osseuse qu'une décongélation « lente » à 4° C.

3. La lyse cellulaire par congélations et décongélations répétées, est réduite quand on maintient ces cellules à —79° C. Au cours de ces opérations, la mortalité des cellules souches, responsables de la restauration hématopoïétique des souris irradiées, est plus rapide que celle de la population entière des cellules nucléées. Pour les cellules souches, la température optimale de conservation est plus élevée, aux environs de —30° C.

4. La protection conférée par les composés à poids moléculaire élevé est minime ; elle est faible avec le dextrane et nulle si on utilise la polyvinylpyrrolidone.

5. Les alcools et polyalcools se sont révélés en général très efficaces. Le glycérol, même en petite quantité (0,90 %), conserve la viabilité des cellules médullaires. La concentration optimale en glycérol est comprise entre 7,5 et 15 %; à la concentration de 30 % il devient toxique pour la cellule.

Le glycérol conserve encore sa propriété protectrice quand les cellules médullaires sont « rapidement » congelées à —30° C. Cette propriété protectrice est diminuée de façon notable par une congélation « rapide » à —79° C, elle disparaît quand les suspensions cellulaires sont portées directement à —196° C.

Nous avons remarqué que la concentration optimale en glycérol est réduite par des vitesses plus rapides de congélation; elle n'est plus que de 3,7 % quand on emploie l'immersion directe à —79° C.

La protection conférée par les polyalcools est fonction du poids moléculaire de ces composés; elle augmente des tétra-alcools aux hexa-alcools.

6. Une excellente protection est obtenue avec les polyalcools (glycérol, sorbitol, mannitol), mais les oses dérivés sont parfois, comme c'est le cas pour le ribose, beaucoup plus actifs.

7. Les acides aminés sont beaucoup moins actifs que les polyalcools; certains ne possèdent aucune action protectrice, comme la cystéine, l'asparagine, la lysine et l'arginine. Parmi les composés protecteurs, il n'y a pas de relation simple entre la concentration optimale du composé et son poids moléculaire.

8. Lovelock a montré que la mort de la cellule soumise à congélation est le résultat de l'augmentation de la concentration extra-cellulaire en électrolytes. Nous avons cependant établi qu'il est possible de protéger la moelle osseuse de souris soumise à congélation, par des composés minéraux sodiques. Les résultats obtenus suggèrent l'existence de deux concentrations optimales de protection qui permettraient l'établissement d'une courbe bimodale concentration-protection; ceci indique que la mort cellulaire est le résultat de plusieurs facteurs, dont

l'augmentation de la pression saline extra-cellulaire n'est que le plus apparent.

9. Les expériences de conservation prolongée par les basses températures montrent que la moelle osseuse maintenue à —30° C perd son efficacité restauratrice après 6 mois, alors qu'elle la conserve encore après 12 mois à —79° C et 29 mois à —196°C.

Au point de vue cytologique, s'il y a une faible perte cellulaire à —196° C, la lyse cellulaire à —30° C et —79° C est relativement forte. Le nombre N de cellules conservées à la température T durant la période t, est donnée par la relation suivante : $N = A^{-kt}$.
où A est une constante et K le coefficient de conservation. De plus, nous avons noté expérimentalement une variation régulière du coefficient de conservation K en fonction de la température T.

10. Nos expériences de culture *in vitro* de cellules animales isolées confirment les précédents résultats. La congélation « lente » s'est révélée la moins nocive pour la survie de la souche épithélioïque de Girardi Heart (clone 7A6). L'addition de composés protecteurs augmente la survie cellulaire, qui est faible avec le mannitol mais importante avec le glycérol.

Dans la pratique, nous pouvons conclure qu'il est possible de préserver la viabilité de la cellule animale en la conservant à très basses températures. On ajoute au milieu de survie des composés protecteurs dont le plus utilisé est un soluté de Tyrode contenant 15 % de glycérol. On utilise la congélation « lente » pour porter la cellule aux basses températures et on ramene la cellule à la vie par la décongélation « rapide ».

Outre le champ immense des applications pratiques dans le domaine de la conservation des tissus et des organes, la diminution du métabolisme d'un organisme animal, la production d'effets génétiques, la cryobiologie ouvre des perspectives insoupçonnées. Car, comment peut-on concevoir le maintien de la vie dans la cellule congelée, sur un substrat inerte et d'apparence minérale ?

Comment peut-on concevoir cet état d'anabiose qui n'est pas la vie, mais qui n'est pas non plus la mort puisqu'il n'interdirait pas la reprise ultérieure du fonctionnement vital ?

Spallanzani disait déjà : « Une vie très faible, très petite est toujours une vie et, entre elle et la mort, il y a l'infini, comme entre l'être et le néant. »

Vu : *Le Président de Thèse :*
D. VINCENT.

Vu : *Le Doyen,*
Pour le Doyen, l'Assesseur :
P. BLANC.

Vu et permis d'imprimer :
Toulouse, le 15 octobre 1962

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université :
P. DOTTIN.

BIBLIOGRAPHIE

ANDERSON (J.). — The semen of animals and its use for artificial insemination. (*Animal Breed. Abstr.*, 1945, *13*, 118).

ASHWOOD-SMITH (M.J.). — Viability of mouse bone marrow frozen to —79° C in the presence of dimethyl sulfoxide. *J. Physiol.*, 1961a, *155*, 26 P.

ASHWOOD-SMITH (M.J.). — Preservation of mouse bone marrow at —79° C with dimethyl sulfoxide. *Nature*, 1961b, *190*, 1204.

ASHWOOD-SMITH (M.J.). — The low temperature preservation of mouse bone marrow with dimethyl sulfoxide. *In : Compt. rend. 8e Congr. Soc. Europ. Hematol.* (1 vol., Basel, 1962, Karger, édit.).

ASHWOOD-SMITH (M.J.) et YOUNG (M.R.). — Fluorescence microscopy of mouse bone marrow cells. *J. Roy. Microscop. Soc.*, 1962b, *80*, 191.

BARNES (D.W.H.) et LOUTIT (J.F.). — The radiation recovery factor : preservation by the Polge-Smith-Parkes technique. (*J. Nat. Cancer Inst.*, 1955, *15*, 901.).

BECQUEREL (P.). — La suspension de la vie des spores, des bactéries et des moisissures desséchées dans le vide vers le zéro absolu. Ses conséquences pour la dissémination et la conservation de la vie dans l'univers. *Compt. rend. As. Sc.*, 1950, *231*, 1392.

BECQUEREL (P.). — La suspension de la vie aux confins du zéro absolu entre 0,0075° K et 0,047° K. Rôle de la synérèse reversible cytonucléoplasmique (p. 236, in: *Proc. 8th Intern. Congr. Refrig.*, 1 vol,. Londres, 1951, Intern. Inst. Refrig., éd.).

BECQUEREL (P.). — La cryosynérèse cytonucléoplasmique et sa distinction de la plasmolyse, de la coagulation et de la solidification du protoplasma congelé. *Compt. rend. As. Sc.*, 1953, *287*, 1473.

BELEHRADEK (J.). — *Temperature and living matter.* (1 vol., Berlin, 1935, Borntraeger, éd.).

BENDER (M.A.), PHAN THE TRAN et SMITH (L.H.). — Preservation of viable bone marrow cells by freezing. (*J. Appl. Physiol.* 1960, *15*, 520).

BILLINGHAM (R.E.). — The preservation of tissues. In : *Biological applications of freezing and drying*, éd. par R.J.C. Harris (1 vol., New York, 1954, Academic Press Inc., éd.).

BILLINGHAM (R.E.) et MEDAWAR (P.B.). — The freezing, drying and storage of mammalian skin. (*J. Exp. Biol.*, 1952a, *29*, 454).

BILLINGHAM (R.E.) et MEDAWAR (P.B.). — The viability of mammalian skin after freezing, thawing and freeze-drying. In : *Freezing and drying*, éd. par R.J.C. Harris (1 vol., New York, 1952b, Hafner, éd.).

BREEDIS (C.). — The action of extreme cold on leukemic cells of mice. (*J. Exp. Med.*, 1942, *76*, 221).

BROWN (H.T.) et ESCOMBE (F.). — Note on the influence of very low temperature on the germinative power of seeds. (*Proc. Roy. Soc. London*, 1897, *62*, 160).

CHAMBERS (R.) et HALE (H.P.). — The formation of ice in protoplasm. (*Proc. Roy. Soc. London, B*, 1932, *110*, 336).

Chang (M.C.) et Walton (A.). — The effects of low temperature and acclimatization on the respiratory activity and survival of ram spermatozoa. (*Proc. Roy. Soc. London, B,* 1940, *129,* 517).

Congdon (C. C.). — Recovery from radiation injury, with special consideration of the use of bone marrow transplantation. In : *Progress in hematology,* vol. II, éd. par L. M. Tocantins (1 vol., New York, 1959, Grune et Stratton, éd.)

Craigie (J.). — The preservation of suspensions of tumour cells in dextrose et low temperatures (*Brit. J. Cancer,* 1949, *3,* 268).

Deanesly (R.). — Histological evolution of rat gonadal tissue transplanted after freezing and thawing. In : *Preservation and transplantation of normal tissues,* A Ciba Foundation Symposium, éd. par G.E.W. Wolstenholme et M.P. Cameron (1 vol., Boston, 1954, Little, Brown and Co, éd.).

Deanesly (R.). — Egg survival in immature rat ovaries grafted after freezing and thawing. (*Proc. Roy. Soc. London, B,* 1957, *147,* 412).

Emmens (C. W.). — The effects of variations in osmotic pressure and electrolyte concentration on the motility of rabbit spermatozoa at different hydrogen-ion concentrations. (*J. Physiol. London,* 1948, *107,* 129).

Ferrebee (J. W.), Billen (D.), Urso (I. M.), Lu (W. C.), Thomas (E. D.) et Congdon (C. C.). — Preservation of radiation recovery factor in frozen marrow. (*Blood,* 1957, *12,* 1096).

Finn (D. B.). — Denaturation of proteins in mucle juice by freezing. (*Proc. Roy. Soc. London, B,* 1932, *111,* 396).

Fulton (J. D.) et Smith (A. U.). — Preservation of Entamoeba histolytica at —79° C in presence of glycerol. (*Ann. Trop. Med.,* 1953, *47,* 240).

Hanks (J. H.) and Wallace (R. E.). — Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,* 1949, *71,* 196).

Harris (R. J. C.). — *Biological applications of freezing and drying.* (1 vol., New York, 1954, Academic Press, Inc., éd.).

Harris (R. J. C.). — *Freezing and drying.* (1 vol., New York, 1952, Hafner Publishing Cie, éd.).

Hauschka (T. S.), Mitchell (J. T.) et Niederpruem (D. J.). — A reliable frozen tissue bank : viability and stability of 82 neoplastic and normal cell types after prolonged storage at —78° C. (*Cancer Research,* 1959, *19,* 643).

Hoskins (J. M.), Meynell (G. G.) et Sanders (F. K.). A comparison of methods for estimating the viable count of a suspension of tumour cells. (*Exp. Cell. Research,* 1956, *11,* 297).

Joslyn (M. A.). — Enzyme activity in frozen vegetable tissue. In : *Advances in enzymology,* vol. IX, éd. par F. F. Nord (1 vol., New York, 1949, Interscience Publishers, éd.).

Joslyn (M. A.). — The action of enzymes in the dried state and in concentrated solution (p. 341, in : *Proc. 8th Intern. Congr. Refrig.,* 1 vol., Londres, 1951, Intern. Inst. Refrig., éd.).

Lipschutz (A.). — Transplantation d'ovaires après dessication. (*Compt. rend. soc. biol.,* 1929, *100,* 95).

Lorenz (E.), Uphoff (D.), Reid (T. R.) et Shelton (E.). — Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. (*J. Nat. Cancer Inst.,* 1951, *12,* 197).

Lovelock (J. E.). — The hemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. (*Biochim. et Biophys. Acta,* 1953 a, *10,* 414).

Lovelock (J. E.). — The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. (*Biochim. et Biophys. Acta,* 1953 b, *11,* 28).

LOVELOCK (J. E.). — Biophysical aspects of the freezing of living cells. In : *Preservation and transplantation of normal tissues*, A Ciba Foundation Symposium, éd. par G. E. W. Wolstenholme et M. P. Cameron (1 vol., Boston, 1954 a, Little, Brown and Co, éd.).

LOVELOCK (J.E.). — The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. (*Biochem. J.*, 1954 b, *56*, 265).

LOVELOCK (J. E.). — The denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing. (*Proc. Roy. Soc. London, B*, 1957, *147*, 427).

LUYET (B. J.). — Effects of ultra-rapid and slow freezing and thawing on mammalian erythrocytes (*Biodynamica*, 1949, *6*, 217).

LUYET (B. J.). — Survival of cells, tissues, and organisms after ultra-rapid freezing. P. 77. In : *Freezing and drying*, éd. par R. J. C. Harris (1 vol., New York, 1952, Hafner Publishing Cie, éd.).

LUYET (B.J.) et GEHENIO (P.M.). — *Life and death at low temperature* (1 vol., Normandy, Miss., 1940, Biodynamica, éd.).

LUYET (B. J.) et HODAPP (E. L.). — Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1938, *39*, 433).

MACFAYDEN (A.) et ROWLAND (S.). — Further note on the influence of the temperature of liquid air on bacteria. (*Proc. Roy. Soc. London*, 1900 a, *66*, 339).

MACFAYDEN (A.) et ROWLAND (S.). — Influence of the temperature of liquid hydrogen on bacteria. (*Proc. Roy. Soc. London*, 1900 b, *66*, 488).

MERYMAN (H. T.). — Physical limitations of the rapid freezing method. (*Proc. Roy. Soc. London, B*, 1957, *147*, 452).

MORAN (T.). — The effect of low temperatures on hen's eggs. (*Proc. Roy. Soc. London, B*, 1925, *98*, 436).

MORAN (T.). — Critical temperature of freezing : living muscle. (*Proc. Roy. Soc. London, B*, 1929-1930, *105*, 177).

MORGAN (J. F.), MORTON (H. J.) and PARKER (R. C.). — Nutrition of animal cell in tissue culture. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1950, *73*, 108).

PARKES (A. S.). — Preservation of human spermatozoa at low temperatures. (*Brit. Med. J.*, 1945, *ii*, 212).

PARKES (A. S.). — Viability of ovarian tissue after freezing. (*Proc. Roy. Soc. London, B*, 1957, *147*, 520).

PARKES (A. S.) et SMITH (A. U.). — Regeneration of rat ovarian tissue grafted after exposure to low temperatures. (*Proc. Roy. Soc. London, B*, 1952-1953, *140*, 455).

PARKES (A. S.) et SMITH (A. U.). — *Recent research in freezing and drying* (1 vol., Oxford, 1960, Blackwell Scientific Publications, éd.).

PASSEY (R. D.) et DMOCHOWSK((L.). — Freezing and desication of mouse tumours. (*Brit. Med. J.*, 1950, *ii*, 1129).

PEGG (D. E.) et TROTMAN (R. E.). — The preservation of human bone marrow at —79° C. (*J. Clin. Pathol.*, 1959, *12*, 477).

PHAN THE TRAN et BENDER (M.A.). — Factors affecting survival of mouse bone marrow cells during freezing and thawing in glycerol. (*J. Appl. Physiol.*, 1960 a, *15*, 939).

PHAN THE TRAN et BENDER (M. A.). — Effet de la moelle osseuse de souris, après congélation en présence de quelques oses et de leurs dérivés polyalcooliques, sur la survie après irradiation par une dose léthale de rayons X. (*Compt. Rend. Soc. Biol.*, 1960 b, *154*, 1090).

PHAN THE TRAN et BENDER (M. A.). — Survival of mouse bone marrow cells frozen and thawed in solutions of animo acids. (*Exp. Cell Res.*, 1960 c, *20*, 651).

Phan The Tran et Bender (M. A.). — Protection of mouse bone marrow by inorganic compounds during freezing and thawing. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1960 d, *104*, 388).

Phan The Tran et Bender (M. A.). — La conservation de la cellule vivante. Applications à la moelle osseuse. (*Rev. Fr. Et. Clin. Biol.*, 1960 e, *5*, 1020).

Phan The Tran et Bender (M. A.). — Preservation of viable bone marrow by freezing. (*Radiobiology*, éd. par P. L. T. Ilbery, 1 vol., London, 1961, Butterworth, éd.).

Phan The Tran et Bender (M. A.). — Durée de conservation de la moelle osseuse congelée de souris. *Compt. rend. Soc. Biol.*, en prép.

Phan The Tran et Bender (M. A.). — Etude quantitative de la survie de la souche épithélioïque de Girardi Heart (clone 7 A 6) après congélation. *Compt. rend. Soc. Biol.*, en prép.

Polge (C.). — Functional survival of fowl spermatozoa after freezing at —79° C. (*Nature*, 1951, *167*, 949).

Polge (C.) et Lovelock (J. E.). — Preservation of bull semen at —79° C. (*Vét. Rec.*, 1952, *64*, 396).

Polge (C.) et Rowson (L. E. A.). — Storage of bull semen at —79° C and fertility results for up to twelve months. (*Vét. Record*, 1953, *65*, 677).

Polge (C.), Smith (A. U.) et Parkes (A. S.). — Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. (*Nature*, 1949, *164*, 666).

Porter (K. A.) et Murray (J. E.). — Successful homotransplantation of rabbit bone marrow after preservation in glycerol at —70° C. (*Cancer Research*, 1958, *18*, 117).

Puck (T. T.). — Quantitative studies on mammalian cells in vitro. (*Rev. Mod. Phys.*, 1959, *31*, 433).

Puck (T. T.), Marcus (P. I.) et Cieciura (S. J.). — Clonal growth of mammalian cells in vitro. (*J. Exp. Med.*, 1956, *103*, 273).

Pryde (J. A.) et Jones (G. O.). — The properties of vitreous water. (*Nature*, 1952, *170*, 685).

Rey (L. R.). — Studies on the action of liquid nitrogen on cultures in vitro of fibroblast. (*Proc. Roy. Soc. London, B*, 1957 a, *147*, 460).

Rey (L. R.). — Dispositif pour l'examen microscopique aux basses températures. *Experientia*, 1957 b, *13*, 201.

Rey (L. R.). — Physiologie du cœur de l'embryon de poulet *in vitro*, après congélation à très basse température. (*J. Embryol. Exp. Morph.*, 1958, *6*, 171

Rey (L. R.). — *Conservation de la vie par le froid* (1 vol., Paris, 1960. Hermann, éd.).

Rey (L. R.). — La vie et la mort aux confins du zéro absolu. *Rev. Méd. Tours*, 1962, *3*, 373.

Richards (V.) et Persidsky (M.). — Studies in preservation of bone marrow with polyvinylpyrrolidone. In : *Fundamental and clinical aspects of radiation protection and recovery* (1 vol., Oak Ridge, 1961, O.R.N.L., éd.).

Rostand (J.). — La glycérine et la résistance du sperme aux basses températures. *Compt. rend. Ac. Sc.* 1946, *234*, 2310.

Rostand (J.). — Les effets biologiques du froid. (*Produits Pharmaceutiques*, 1959, *14*, 57).

Rous (P.) et Jones (F. S.). — A method for obtaining suspensions of living cells from the fixed tissues and for plating out of individual cells. (*J. Exp. Med.*, 1916, *23*, 549).

Schrek (R.). — A method for counting the viable cells in normal and in malignant cell suspensions. (*Am. J. Cancer*, 1936, *28*, 389).

Schwartz (L. R.), Repplinger (E. F.), Congdon (C. C.) et Tocantins (L. M.). Transplantation of bone marrow after preservation at —70° C. (*J. Appl. Physiol.*, 1957, *11*, 22).

Shaffner (C. S.). — Longevity of fowl spermatozoa in frozen conditions. (*Science*, 1942, *96*, 337).

Sizer (I. W.) et Josephson (E. S.). — Kinetics as a function of temperature of lipase, trypsin, and invertase activity from —70° to 50° C. (*Food Research*, 1942, *7*, 201).

Sloviter (H. A.). — Recovery of human red blood cells after freezing. (*Lancet*, 1951, *i*, 823).

Smart (H. F.). — Growth and survival of microorganisms at subfreezing temperatures. (*Science*, 1935, *82*, 525).

Smith (A. U.). — Prevention of haemolysis during freezing and thawing of red blood-bells. (*Lancet*, 1950, *ii*, 910).

Smith (A. U.). — Behaviour of fertilized rabbit eggs exposed to glycerol and to low temperatures. (*Nature*, 1952, *170*, 374).

Smith (A. U.). — Effects of low temperatures on living cells and tissues. In : *Biological applications of freezing and drying*, éd. par R.J.C. Harris (1 vol., New York, 1954, Academic Press Inc., éd.).

Smith (A. U.). — *Biological effects of freezing and supercooling*, (1 vol., Londres, 1961, Edward Arnold, éd.).

Smith (A.U.) et Polge (C.). — Survival of spermatozoa at low temperatures. (*Nature*, 1950, *166*, 668).

Smith (A. U.), Polge (C.) et Smiles (J.). — Microscopic observation of living cells during freezing and thawing. (*J. Roy. Microscop. Soc.*, 1951, *71*, 186).

Smith (A. U.) et Smiles (J.). — Microscopic studies of mammalian tissues during cooling to —79° C. (*J. Roy. Microscop. Soc.*, 1953, *73*, 134).

Smith (L. H.) et Congdon (C. C.). — Experimental treatment of acute whole-body radiation injury in mammals. (In : *Radiation protection and recovery*, éd. par A. Hollaender, 1 vol., New York, 1960, Pergamon Press, éd.)

Spallanzani (L.). — *Opuscule de physique animale et végétale*, 1 vol., Pavie et Paris, 1787, Pierre Duplain, éd.

Stiles (W.). — On the cause of cold death of plants. (*Protoplasma*, 1930, *9*, 459).

Strumia (M. M.). — Freezing of whole blood. (*Science*, 1949, *110*, 398.

Swim (H. E.), Haff (R. F.) et Parker (R. F.). — Some practical aspects of storing mammalian cells in the dry-ice chest. (*Cancer Research*, 1958, *18*, 711).

Tamman (G.), cité par B. J. Luyet (1952) de (*S. Phys. Chem.*, 1898, *25*, 472).

Thiselton-Dyer (W.). — On the influence of the temperature of liquid hydrogen on the germinative power of seeds. (*Proc. Roy. Soc. London*, 1899, *65*, 361).

Urso (I. S.) et Congdon (C. C.). — Short-term preservation of mouse bone marrow at refrigeration and room temperature for irradiation experiments. (*J. Appl. Physiol.*, 1957, *10*, 314).

Weinman (D.) et Mcallister (J.). — Prolonged storage of human pathogenic protozoa with conservation of virulence : observations on the storage of helminths and leptospira. (*Am. J. Hyg.*, 1947, *45*, 102).

Wolstenholme (G. E. W.) et Cameron (M. P.). — *Preservation and transplantation of normal tissues.* (Boston, 1954, Little Brown et Cie, éd.).

TABLE DES MATIÈRES

Introduction 11

CHAPITRE PREMIER

Technique d'études : la greffe de cellules médullaires isologues chez la souris léthalement irradiée 15

I. — *Animaux utilisés* 16

II. — *Conditions d'irradiation* . . . . . »

III. — *Préparation des suspensions cellulaires* . . . . . »

IV. — *Technique de congélation* 17

V. — *Températures de conservation* . . »

VI. — *Mesures de la survie des cellules médullaires* . . . . . »

CHAPITRE II

Influence des vitesses de congélation et de décongélation sur la survie des cellules médullaires. Congélations répétées 19

I. — *Vitesses de congélation* . . . . . »

II. — *Vitesses de décongélation* 21

III. — *Congélation et décongélation répétées* 22

CHAPITRE III

ACTION DES COMPOSÉS ORGANIQUES SUR LA SURVIE DES CELLULES MÉDULLAIRES SOUMISES A CONGÉLATION 27

I. — *Composés à poids moléculaire élevé* . . . . . »

II. — *Alcools et polyalcools* 28

III. — *Oses et osides* 35

IV. — *Acides aminés* 36

CHAPITRE IV

ACTION DES COMPOSÉS MINÉRAUX SUR LA SURVIE DES CELLULES MÉDULLAIRES SOUMISES A CONGÉLATION 39

CHAPITRE V

DURÉE DE CONSERVATION DE LA MOELLE OSSEUSE CONGÉLÉE 45

CHAPITRE VI

CULTURE *in vitro* DE CELLULES ANIMALES CONGELÉES 51

I. — *Technique de Puck, modifiée par PHAN et BENDER* . . . . . »

II. — *Résultats* 53

CONCLUSIONS 57

BIBLIOGRAPHIE 61